

이학박사 학위논문

갈조류 파배기모자반(*Sargassum siliquastrum*)과

쇠비름(*Portulaca oleracea*)으로부터

생리활성물질의 분리와 구조결정

Isolation and Structure Determination of Bioactive
Constituents from a Brown Alga *Sargassum siliquastrum* and a
Terrestrial Vascular Plant *Portulaca oleracea*(*Purslane*)

지도교수 서영완

2012 년 2 월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과

이 정 임

이학박사 학위논문

갈조류 파배기모자반(*Sargassum siliquastrum*)과

쇠비름(*Portulaca oleracea*)으로부터

생리활성물질의 분리와 구조결정

Isolation and Structure Determination of Bioactive
Constituents from a Brown Alga *Sargassum siliquastrum* and a
Terrestrial Vascular Plant *Portulaca oleracea*(Purslane)

지도교수 서영완

2012 년 2 월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과

이 정 임

本 論文을 이정임의
理學博士 學位論文으로 認准함.

위원장 임 선 영 (인)

위 원 이 범 중 (인)

위 원 임 치 원 (인)

위 원 박 미 정 (인)

위 원 서영 완 (인)

2012 년 2 월

한국해양대학교 대학원

Contents

Contents	i
List of Tables	vii
List of Figures	viii
List of Schemes	xv
Abstract (in Korean)	xvi



1. 서론.....	1
1.1. 해양생물 유래의 천연물질 탐색	1
1.2. 갈조 해조류 파배기 모자반(<i>S. siliquastrum</i>)	2
1.3. 쇠비름(<i>Portulaca oleracea</i> Linne)	5
1.4. homoisoflavonoids	11
1.4.1. Characters and bioactivity of Homoisoflavonoids	11
1.4.2. Synthesis of homoisoflavonoids	19
2. 재료 및 방법	24
2.1. 재료	24
2.2. 시약	24
2.2.1. 분리 및 합성	25
2.2.2. 활성	25
2.2.3. 기기	24
2.3. 파배기모자반(<i>S. siliquastrum</i>)의 추출 및 분리	26
2.3.1. 추출	26
2.3.2. 모자반의 활성 성분 분리	28
2.4. 쇠비름(<i>P. oleracea</i>)의 추출 및 분리	30

2.4.1. 추출	30
2.4.2. 화합물의 분리	32
2.5. Homoisoflavonoids 합성	34
2.5.1. 3,5-dimethoxyphenol 합성 및 분리.....	34
2.5.2. 3-(3,5-dimethoxyphenoxy)propanoic acid 합성 및 분리.....	34
2.5.3. 5,7-dimethoxychroman-4-one 합성 및 분리	35
2.5.4. (E)-5,7-dimethoxy-3-[(2-methoxyphenyl)methylene]chroman-4-one 합성 및 분리	35
2.5.5. 5,7-dimethoxy-3-(2-methoxyphenyl)chroman-4-one 합성 및 분리 .	36
2.6. 항산화 활성 실험	36
2.6.1. DPPH radical 소거 활성 측정.....	36
2.6.2. Peroxynitrite 소거 활성 측정.....	37
2.6.3. 세포배양	37
2.6.4. 세포내 활성 산소종(ROS, reactive oxygen speices)	38
2.6.5. TBARS 법을 이용한 lipid peroxidation 측정	38
2.6.6. GSH contents 측정	39
2.7. 암세포 증식억제 실험	39
2.8. 항비만 활성 실험	40

2.8.1. 3T3-L1 세포의 배양 및 지방세포로의 분화 유도	40
2.8.2. 3T3-L1 전구 지방세포에서의 세포 분화능 측정	41
2.8.3. Glycerol 분비 측정	41
2.8.4. Glucose 소비 측정	41
2.8.5. Leptin 측정	41
2.8.6. 비만 관련 유전자 발현 측정	42
2.9. 통계분석	44
 3. 결과 및 고찰	 45
3.1. 이차대사산물 분리 및 구조 결정	45
3.1.1. 파배기 모자반으로부터 활성 성분의 구조 결정(1-3)	45
3.1.2. 쇠비름으로부터 활성 성분의 구조 결정(7-13)	57
3.1.3. Homoisoflavonoids 합성	72
3.2. <i>S. siliquastrum</i> 으로부터 분리된 이차대사산물의 생리활성	77
3.2.1. <i>S. siliquastrum</i> 으로부터 분리한 compounds 1-3 의 인체유래의 암세포 증식억제효과	77
3.2.2. <i>S. siliquastrum</i> 으로부터 분리한 compounds 1-3 의 항산화 효과 ..	79
3.2.2.1. DPPH radical 소거 효과	79

3.2.2.2. Peroxynitrite 소거 효과	79
3.2.2.3. 세포 독성 효과	83
3.2.2.4. 활성 산소종(ROS) 소거 효과	84
3.2.2.5. 지질과산화 억제 효과	86
3.2.2.6 세포내 GSH(glutathion) 함량	86
3.3. <i>P. oleracea</i> 의 추출물 및 분획물의 암세포 증식억제효과	88
3.4. <i>P. oleracea</i> 로부터 분리된 이차대사산물의 생리활성	94
3.4.1. <i>P. oleracea</i> 로부터분리된 compounds 7-10 및 12-13 의 암세포 증식억제효과	94
3.4.2. <i>P. oleracea</i> 로부터분리된 compounds 7-10 및 12-13 의 활성 산소종(ROS) 소거 효과	96
3.4.3. <i>P. oleracea</i> 로부터분리된 compounds 7-10 의 항비만 효과	98
3.4.3.1. 3T3-L1 전구 지방세포에서의 세포 분화능 측정	98
3.4.3.2. Glucose 소비 측정	100
3.4.3.3. Glycerol 분비 측정	102
3.4.3.4. Leptin 측정	104
3.4.3.5. 비만 관련 유전자 발현 측정	106
3.4.3.5.1. 핵심 조절 전사인자 발현	106

3.4.3.5.2. 표적 유전자 발현	109
3.4.3.5.3. Adipocytokine 유전자 발현	113
3.4.3.5.4. 지방분해 유전자 발현	115
 4. 결 론	 117
 참고문헌	 121
 부록	 138



List of Tables

Table 1. Chemical structures of 3-benzyl-4-chromanone derivatives	13
Table 2. Chemical structures of 3-benzylidene-4-chromanone derivatives ...	16
Table 3. Chemical structures of scillascillin-type homoisoflavonoids	16
Table 4. Chemical structures of 3-benzyl-4-chromone	17
Table 5. Sequences of primer used for RT-PCR	43
Table 6. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound 1	50
Table 7. ^1H NMR spectral data for compounds 2 , 3 , and sagachromanol K(6) ..	51
Table 8. ^{13}C NMR spectral data for compounds 2 , 3 , and sagachromanol K(6)..	52
Table 9. ^{13}C NMR data for compounds 7-12 isolated from <i>P. oleracea</i>	66
Table 10. ^1H NMR data for compounds 7-9 isolated from <i>P. oleracea</i>	67
Table 11. ^1H NMR data for compounds 10-12 isolated from <i>P. oleracea</i>	68

List of Figures

Figure 1. Compounds isolated from Brown algae.	4
Figure 2. Compounds isolated from <i>P. oleracea</i>	8
Figure 3. A new type of homoisoflavonoids recently isolated	18
Figure 4. Synthesis of 3-benzyl-4-chromanones.	19
Figure 5. Reagents and conditions.	20
Figure 6. Reagents and conditions.	21
Figure 7. Reagents and conditions:.....	22
Figure 8. Photographs of (a) <i>P. oleracea</i> , and (b) <i>S. siliquastrum</i>	24
Figure 9. Chemical structure of compounds 1-6 from <i>S. siliquastrum</i>	56
Figure 10. Chemical structure of compounds 7-13 from <i>P. oleracea</i>	71
Figure 11. Reagent and condition of homoisoflavonoids synthesis.	74
Figure 12. Antiproliferative effects of compounds 1-3 isolated from <i>S. siliquastrum</i> in AGS (a), HT-29 (b), HT-1080 (c), and MCF-7 (d) cells.	78
Figure 13. Scavenging effects of compounds 1-3 from <i>Sagassum siliquastrum</i> on DPPH radical.	81

Figure 14. Scavenging effect of compounds 1-3 from <i>Sargassum siliquastrum</i> on ONOO ⁻ from SIN-1(a) and authentic ONOO ⁻ (b)	82
Figure 15. Effect of compounds 1-3 from <i>S. siliquastrum</i> on viability of HT1080 cells.	83
Figure 16. Effects of compounds 1-3 isolated from <i>S. siliquastrum</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	85
Figure 17. Effect of compounds 1-3 isolated from <i>S. siliquastrum</i> on (a) membrane lipid peroxidation and GSH contents at 5 µg/mL. .	87
Figure 18. Effect of crude extract and its solvent fractions from <i>P. oleracea</i> on viability of HT1080 cells.	90
Figure 19. Effect of crude extract and its solvent fractions from <i>P. oleracea</i> on viability of HT-29 cells.	91
Figure 20. Effect of crude extract and its solvent fractions from <i>P. oleracea</i> on viability of AGS cells.	92
Figure 21. Effect of crude extract and its solvent fractions from <i>P. oleracea</i> on viability of MCF-7 cells.	93
Figure 22. Antiproliferative effects of compounds 7-10 , and 12-13 isolated from <i>P. oleracea</i> in HT-1080 (a), HT-29 (b), AGS (c), and MCF-7 (d) cells.	95

Figure 23. Effects of compounds 7-10 , and 12-13 isolated from <i>P. oleracea</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT1080 cells.	97
Figure 24. Observation of lipid droplets stained with Oil Red O staining in 3T3-L1 adipocyte.	99
Figure 25. Effect of compounds 7-10 from <i>Portulaca oleracea</i> on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes by Oil-Red O staining ...	99
Figure 26. Effects of compounds 7-10 from <i>Portulaca oleracea</i> on glucose consumption.	101
Figure 27. Effects of compounds 7-10 from <i>Portulaca oleracea cava</i> on glycerol secretion.	103
Figure 28. Effects of compounds 7-10 from <i>Portulaca olreacea</i> on leptin secretion.	105
Figure 29. Effect of compounds 7-10 from <i>Portulaca oleracea</i> on adipogenic transcriptional factors in 3T3-L1 adipocytes.	108
Figure 30. Effect of compounds 7-10 from <i>Portulaca oleracea</i> on adipogenic target gene expression in 3T3-L1 adipocytes.	109
Figure 31. Effects of compounds 7-10 from <i>Portulaca oleracea</i> on adipogenic target gene expression in 3T3-L1 adipocytes ...	112

Figure 32. Effects of compounds 7–10 from <i>Portulaca oleracea</i> on adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes	114
Figure 33. Effect of compounds 7–10 from <i>Portulaca oleracea</i> on lipolysis response gene expression in 3T3-L1 adipocytes	116
Figure 34. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound 1 isolated from <i>Sagassum siliquastrum</i> in CDCl_3	138
Figure 35. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound 1 isolated from <i>Sagassum siliquastrum</i> in CDCl_3	139
Figure 36.gHMQC and gHMBC spectrum of compound 1 isolated from <i>Sagassum siliquastrum</i> in CDCl_3	140
Figure 37. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound 2 isolated from <i>Sagassum siliquastrum</i> in CDCl_3	141
Figure 38.gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound 2 isolated from <i>Sagassum siliquastrum</i> in CDCl_3	142
Figure 39.gHMQC and gHMBC spectrum of compound 2 isolated from <i>Sagassum siliquastrum</i> in CDCl_3	143
Figure 40. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound 3 isolated from <i>Sagassum siliquastrum</i> in CDCl_3	144
Figure 41.gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound 3 isolated from <i>Sagassum siliquastrum</i> in CDCl_3	145

Figure 42. gHMQC and gHMBC spectrum of compound 3 isolated from <i>Sagassum siliquastrum</i> in CDCl ₃ ..	146
Figure 43. ¹ H and ¹³ C NMR spectrum of compound 4 isolated from <i>Sagassum siliquastrum</i> in CDCl ₃ ..	147
Figure 44. ¹ H and ¹³ C NMR spectrum of compound 5 isolated from <i>Sagassum siliquastrum</i> in CDCl ₃ ..	148
Figure 45. ¹ H and ¹³ C NMR spectrum of compound 6 isolated from <i>Sagassum siliquastrum</i> in CDCl ₃ ..	149
Figure 46. ¹ H and ¹³ C NMR spectrum of compound 7 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl ₃ ..	150
Figure 47. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound 7 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl ₃ ..	151
Figure 48. gHMQC and gHMBC spectrum of compound 7 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl ₃ ..	152
Figure 49. ¹ H and ¹³ C NMR spectrum of compound 8 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl ₃ ..	153
Figure 50. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound 8 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl ₃ ..	154
Figure 51. gHMQC and gHMBC spectrum of compound 8 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl ₃ ..	155

Figure 52. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound 9 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl_3	156
Figure 53. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound 9 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl_3	157
Figure 54. gHMQC and gHMBC spectrum of compound 9 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl_3	158
Figure 55. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound 10 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl_3	159
Figure 56. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound 10 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl_3	160
Figure 57. gHMQC and gHMBC spectrum of compound 10 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl_3	161
Figure 58. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound 11 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl_3	162
Figure 59. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound 11 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl_3	163
Figure 60. gHMQC and gHMBC spectrum of compound 11 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl_3	164
Figure 61. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound 12 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CDCl_3 and CD_3OD	165

Figure 62. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound 12 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CD ₃ OD	166
Figure 63. gHMQC and gHMBC spectrum of compound 12 isolated from <i>Portulaca oleracea</i> in CD ₃ OD	167
Figure 64. ¹ H and ¹³ C NMR spectrum of compound 13	168



List of Schemes

Scheme 1. Preparation of crude extraction and its solvent fractions from <i>Sargassum siliquastrum</i>	27
Scheme 2. Isolation of the compounds 1-6 from <i>S. siliquastrum</i>	29
Scheme 3. Procedure of extraction and various fractions from <i>P. oleracea</i> ...	31
Scheme 4. Isolation procedure of compounds (7-13) from <i>P. oleracea</i>	34



Isolation and Structure Determination of Bioactive Constituents from a Brown Alga *Sargassum siliquastrum* and a Terrestrial Vascular Plant *Portulaca oleracea* (Purslane)

Jung Im Lee

Division of Marine Environment and Bioscience, Korea Maritime University,

Abstract

The life of a human being has been extended even more than before due to improvement of medical technology. Nevertheless, the incidence rate of other new forms of diseases such as cancer, hyperlipidemia, diabetes, mental disorders, etc. has also increased greatly. Following extensive research, two common, widely available, natural plants have been found to have antioxidative and antiproliferative properties which may contribute to the prevention or treatment of some diseases or may inhibit the growth of some cancers.

As a part of our search for new bioactive compounds from natural resources, the brown alga *Sargassum siliquastrum* and the terrestrial plant *Portulaca oleracea* were collected. Brown algae of the genus

Sargassum (Sargassaceae) are widely distributed in the temperate and tropical oceans of the world, and often dominate benthic algal communities and occur in huge floating masses. Most species have cycles of vegetative growth and attrition. *Portulaca oleracea* L. (Portulacaceae) is an annual herb growing in warm areas of the world and has been used as traditional and folk remedies for thousands of years in many countries throughout the world.

Each of the collected samples was briefly dried under shade and extracted with a mixture solvent of acetone-CH₂Cl₂ (1:1) at room temperature for 2 days and filtered. Then, the residue was re-extracted with MeOH in the same way. The combined crude extracts of each sample were partitioned between CH₂Cl₂ and water. The organic layer was further partitioned between *n*-hexane and 85% aq. MeOH, and the aqueous layer was partitioned with *n*-BuOH and H₂O, successively.

Previous study has shown 85% aq. MeOH solvent fraction of *S. siliquastrum* crude extracts has antioxidizing and antiproliferative effects. Therefore, six meroterpenoids, including three new ones were obtained from the 85% aq. MeOH fraction by bioactivity-guided separation.

In our measurement for antioxidant activities, compounds **1-3** exhibited the strong scavenging effect on DPPH radical and peroxynitrite in a non-cellular system. In addition, ROS was generated in a cellular system. The

antiproliferative effect of these compounds was also measured against AGS, HT-29, HT-1080, and MCF-7 human cancer cells. In comparative analysis, all compounds showed high growth-inhibitory effects on all cancer cell lines in a dose-dependent manner.

85% aq. MeOH solvent fraction of *P. oleracea* crude extracts showed a significant antiproliferative inhibitory effect against HT-29 colon cancer cells. On the basis of the above result, further purification of 85% aq. MeOH led to the isolation of homoisoflavonoids **7–13**. The chemical structure of these compounds was established by extensive 2D NMR experiments such as ¹H gDQCOSY, TOCSY, NOESY, gHMQC, and gHMBC and by synthesis of authentic compounds.

The antiproliferative effect of compounds **7–10**, **12** and **13** was also evaluated in HT1080, HT-29, AGS and MCF-7 human cancer cells using the MTT assay method. Among them, compound **10** exhibited the strongest antiproliferative inhibitory effect on the growth of human cancer cells in a dose-dependent manner.

The antioxidant activity of these compounds was also evaluated by measuring intracellular ROS level and membrane lipid peroxidation. As a result, compounds **7–10** moderately decreased intracellular ROS level and compound **10** suppressed membrane lipid peroxidation.

The latest report on extracts of *P. oleracea* suggested that it has a lipolytic effect through release of fatty acid and glycerol to the culture medium. Based on the above, the antiobesity effect of compounds **7–10** from *P. oleracea* was also examined by observing Oil-Red O stained lipid droplets in adipocyte and by measuring glycerol release and glucose contents in a culture medium. In addition, expression levels of several genes related to adipogenesis including transcription factors were examined using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). As a result, compounds **7** and **10** not only decreased production of lipid droplets and glucose contents but also increased glycerol release.

Further, the effect of homoisoflavonoids (**7–10**) on the adipogenic differentiation was investigated at the gene expression levels, compounds **9** and **10** induced down-regulation of adipogenic transcription factors (PPAR, C/EBP, PPAR, and SREBP1c) and adipogenic target adipocyte-specific genes (FABP4, FATP1, FAS, LPL, ACS1, perilipin and HSL). Moreover, compounds **9** and **10** down-regulated adipocytokine such as leptin and perilipin, and TNF- α . In short, compounds **9** and **10** have high inhibition effect on intracellular lipid accumulation and may be a valuable potential lead compound for the treatment of obesity.

Therefore, these results suggest that *S. siliquastrum* and *P. portulaca* could be used as the valuable materials for developing biofunctional

substances that may inhibit the growth of cancers, that may protect cells from the damaging effects of oxidation, or that may assist the body in maintaining a constant level of insulin, thereby preventing obesity.



1. 서론

1. 1 해양생물 유래 천연물질의 탐색

삶의 질 향상과 의료서비스의 개선으로 수명이 연장됨에 따라 심장질환, 암, 당뇨, 정신 질환 등 만성 또는 난치성 질환이 증가하고 있으며, 이러한 만성질환의 치료를 위해 사용되는 의약품의 안전성에 대한 관심이 고조되면서, 천연 유래 의약품의 개발에 대한 연구의 필요성이 증대되었다.

인류는 오래 전부터 천연 유래의 생리활성물질을 개발하기 위하여 육상자원으로부터 다양한 유용물질을 탐색하였으며 항암, 항말라리아, 당뇨치료제, 통증완화제 항생제 등 다양한 물질들이 의약품 등으로 개발되어 사용되고 있다. 하지만 수십 년간의 개발로 그 원천이 고갈됨으로서 육상 유래 천연물의 개발이 정체되고 있는 실정이다. 이러한 이유로 해양생물자원이 유용물질의 보고로서 주목을 받게 되었으며 1951 년 미국 플로리다 연안에서 채집된 해면동물 *Cryptotethya crypta*로부터 육상에서 발견된 적이 없는 독특한 구조의 ara-A(vidarabine)과 ara-C(cytarabine)가 분리되면서 해양생물자원에 대한 관심이 크게 증가되었다(Molinski et al. 2009).

해양유래 이차대사산물은 주로 남조류, 진균류, 해조류, 해면 연산호 연체동물들로부터 분리되었으며, 지금까지 nucleoside, peptide alkaloids, macrolide, dike topierazine, diterpene glycoside, polyketide, tripeptide, acetogenins, oxylipins, polyphenol 등 다양한 계열의 물질들이 보고되었다. 이들은 항암, 항바이러스, 항염증, 항산화, 항돌연변이, 멜라닌 생성억제, 항응고 등 다양한 생물학적 활성을 나타내고 있다(Scheuer 1978; Kim et al.

2005; Kong et al. 2008; Kang et al. 2008; Kang et al. 2005; Koo et al. 2001; Kwak et al. 2005).

지구상에 존재하는 3 천 500 만종의 생명체 가운데 80%가 해양에 존재하며 지금까지 연구가 이루어진 종들은 극히 일부에 불과하므로 해양생물자원은 새로운 생리활성물질의 보고로서 무한한 가능성을 가지고 있다. 또한 해양생물은 해양이라고 하는 육상과 매우 다른 환경에서 서식하기 때문에 이런 독특한 환경에 대한 적응으로 육상에서 발견하지 못한 매우 특이한 생화학적 대사산물이 발견될 가능성이 매우 높을 예상된다.

1.2. 갈조 해조류 파배기 모자반(*S. siliquastrum*)

천연물 신약 연구개발을 위한 천연물질 탐색의 일환으로 2000 년대부터 해조류에 대한 관심이 집중되어 왔으며, 그 중에서도 우리나라 연안에서 가장 많이 번성하는 대형 해조류인 미역, 다시마, 김, 톳, 대황, 감태, 모자반 등에 대한 관심이 고조되면서 이에 대한 연구가 활발히 진행되어왔다.

다양한 종류의 해조류가 발견되고 있으며, 이들은 새롭고 다양한 이차대사산물을 함유하고 있다. 또한 양질의 식물성 섬유인 알긴산을 많이 함유하고 있어, 건강식품으로 알려져 있다. 그 중에서도 갈조류인 대황, 감태, 모자반 등으로부터 다양한 이차대사산물이 보고 되고 있으며, 화학 전령자 역할을 하는 간단한 구조를 가진 lipid 로부터 복잡한 구조를 지닌 phlorotannin 과 terpene 계 물질이 많이 존재하는 것으로 알려져 있다. 최근 많은 관심의 대상이 되고 있는 phlorotannin 은 감태, 곰피, 대황에서 주로

분리되었으며, 항산화, 향균, 항고혈압 그리고 항암 활성을 가진다고 보고되어
졌다(Yang et al. 2010; Heo et al. 2008; Nagayama et al. 2002; Athukorala
et al. 2005)(Figure 1).

본 연구에 사용된 파배기 모자반(*S. siliquastrum*)은 갈조류의 모자반목
모자반과에 속하며 한국과 일본에 주로 분포하고 조간대 하부로부터 수심이
깊은 곳까지 서식하며 단단한 바위 기질에 붙어 자란다. 몸의 길이는 2~3 m 에
달하며, 생육하는 환경에 따라 외형의 변화가 매우 심하고 줄기가 꼬여 있는
형태로 되어있다. 이전에 Jang 등(2005)은 chromanol 계열의
물질인 Sargachromanol A-P 를 분리 보고 한 바 있으며, 이들은 모두 높은
항산화 효과를 가지는 것으로 확인되었다. 본 연구팀은 앞선 연구를 통해서
7 개의 chromanol 계열의 화합물을 분리하였으며(Lee and Seo 2010), 분리된
화합물들은 매우 높은 항산화 활성효과를 가지는 것으로 확인되었다. 본
연구에서 분리된 chromanol 계열의 화합물 또한 매우 우수한 항산화 활성을
가질 것으로 예상되며, 이들의 생리 활성을 검색하고자 한다.

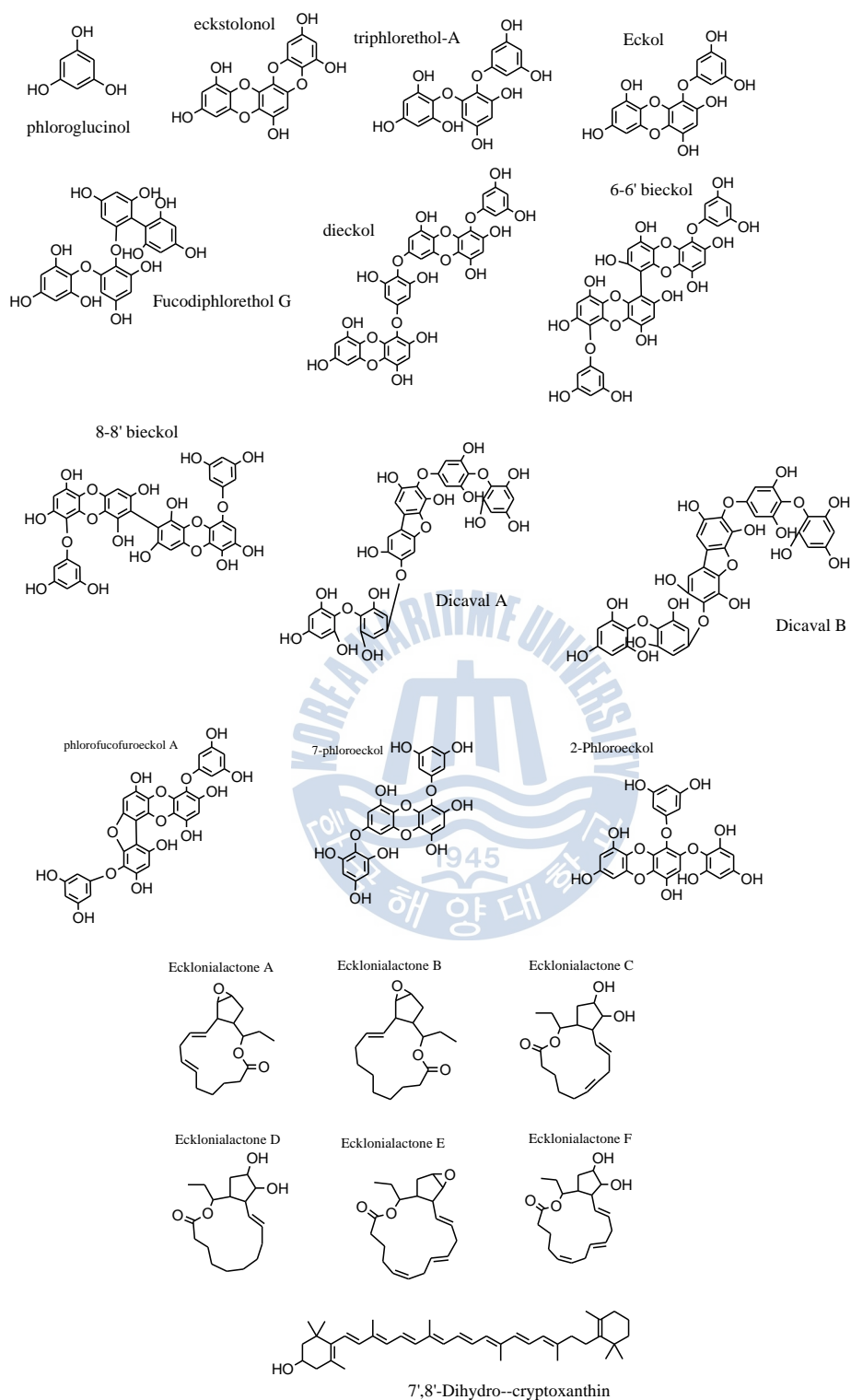


Figure 1. Compounds isolated from Brown algae.

1.3. *Portulaca oleracea* Linne

쇠비름(*Portulaca oleracea* Linne)은 전세계의 온대에서 열대지역까지 널리 분포하는 쇠비름과의 한해살이풀로서, 높이가 30 cm 에 달하며 전체에 털이 없고 육질이며, 뿌리는 흰색이고 줄기는 붉은 빛이 도는 갈색으로 가지가 많이 갈라져서 옆으로 비스듬히 퍼져서 자란다. 주로 수분이 많고 질소 공급이 원활한 곳에서 잘 자라며, 길가나 밭 근처에서도 쉽게 볼수 있으며, 5~9 월에 걸쳐 생육한다. 쇠비름은 뿌리가 흰색, 줄기는 붉은색, 잎은 푸른색, 꽃은 노란색, 씨앗은 검은색으로 다섯 가지 색을 가지고 있다하여 오행초라고 부르기도 한다. 오래 먹으면 장수하고 늙어도 머리카락이 희게 변하지 않는다고 해서 장명채라고도 하고 외에도 산산채, 장명채, 돼지풀, 도둑풀, 말비름이라고도 불린다(Yook, 1989). 쇠비름은 맛이 좋아 예부터 동서양에서 식용으로 사용되었으며, 서양에서는 연한부분을 샐러드로 이용하였고 우리나라에서는 주로 나물등을 만들어 먹었다. 또한 민간요법으로 사용되었는데, ‘동의보감’ , ‘본초강목’ , ‘동의학 사전’ 에 따르면, 쇠비름이 해독, 지혈, 부기완화, 장염, 혈변, 설사, 피부궤양 등의 질병치료에 사용되었고, 고약처럼 만들어 음, 습진, 종기 등의 피부염증이나 상처에도 사용되었다고 한다(Lee 1999, Zhang 2009). 이 외에도 방부제, 진경제, 이뇨제, 구충제, 피부진정제로 사용되었으며, 근육 완화 활성, 니코틴 제거, 항산화, 항균, 항암, 항염증 등에도 효과가 있는것으로 보고 되었다(Habtemariam 1993; Bae 1999; Lim et al. 2000; Lim et al. 2001; Parry et al. 1993). 최근 발표에 따르면, 쇠비름 추출물이 지방 분해를 촉진시키고 HSL(hormone

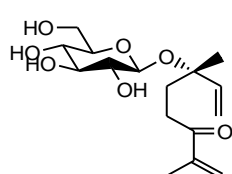
sensitive lipase) 유전자 발현을 증가시키며, type II 당뇨 치료에도 효과적임이 확인되었다(Lee 2006; El-Sayed 2011).

쇠비름의 화학 성분으로 phosphorus, calcium, iron 과 같은 미네랄과 항산화제인 비타민류나 β -carotene, 그리고 γ -linoleic acid 와 ω -3 지방산이 많이 존재하며(Mohamed 1994; Omara-Alwala 1961; Liu 2000), 질소원 화합물로서는 N-trans-feruloyltyramine, dopamine, dopa, 그리고 norepinephrine 등이 풍부한 것으로 알려져 있다(Mizutani et al. 1998; Feng et al. 1961). 이 밖에도 쇠비름의 이차대사산물로서 terpenes, coumarins, flavonoids, alkaloids 그리고 anthocyanins 등 40 여종 이상의 화합물이 보고되었다(Awad 1994; Adachi et al. 1983; Sakai et al. 1996; Mizutani et al. 1998; Feng et al. 1961; Imperato 1975; Piattelli and Minale 1964; Seo Y. et al. 2003; Xin et al. 2008; Elkhayat 2008; Xiang et al. 2005; Liu et al. 2011; Rasheed et al. 2004; Xu et al. 2006)(Figure 2). Yang 등(2009)에 따르면 alkaloids 인 oleracein A, B, D 가 positive 대조군으로 사용된 ascorbic acid 와 α -tocopherol 보다 DPPH radical 소거활성이 더 높은 것으로 나타났으며, Choi 등(2005)에 의해 분리된 protocatechuic acid, ferulic acid, gallic acid 역시 DPPH radical 소거 활성이 높은 것으로 나타났다. β -amyrin type 의 triterpenoids 인 P11 과 P12 는 HepG2 tumor cell 에서 cytotoxic activity 를 보였다(Xin et al. 2008).

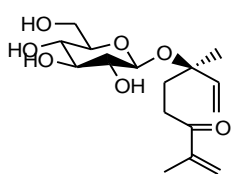
쇠비름에 대한 생리활성 효과는 예로부터 잘 알려져 왔으며, 한방에서 마치현으로 불리며 다양한 질병 치료의 한약재로 사용되고 있다. 하지만

그들의 추출물로부터 분리한 이차대사산물에 대한 생리활성 검색은 DPPH radical 소거능과 cytotoxicity 등에 불과하다. 본 연구에서는 쇠비름으로부터 새로운 이차대사산물을 분리하고 이들의 생리활성을 확인하고자 하였으며, 그 결과, 지금까지 쇠비름에서 분리되지 않은 homosioflavonoid 계열의 새로운 이차대사산물 5 종과 homoisoflavonoid 의 전구체인 chalcone 계열의 화합물, 그 밖에도 알려진 alkaloid 계열의 화합물 및 terpenoids 화합물을 분리·정제하였고, 그들에 대한 생리활성을 검색하였다.

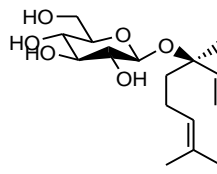




P1 Portuloside A

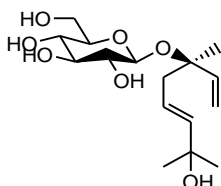


P2

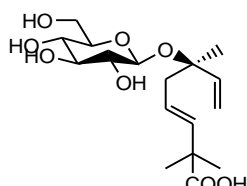


P3

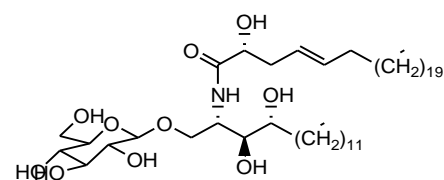
Sakai et al (1996)



P4



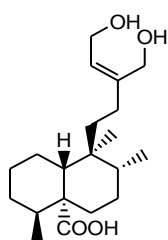
P5



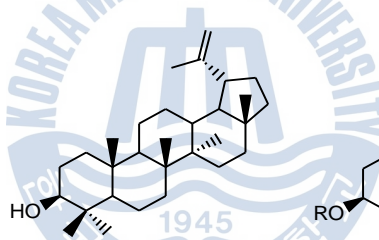
P6 Portulacerebroside A

Seo et al (2003)

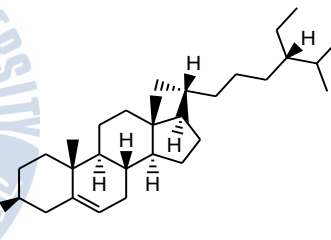
Xin et al (2008)



P7 portulene

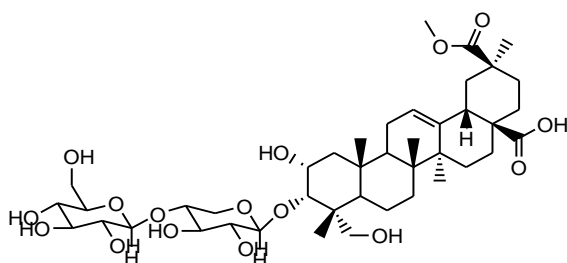


P8 lupeol

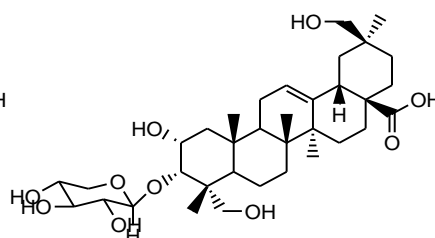


P9 R=H : β -sitosterol
P10 R= Glucose : daucosterol

Elkhayat (2008)



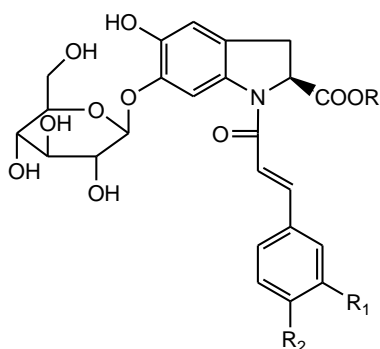
P11



P12

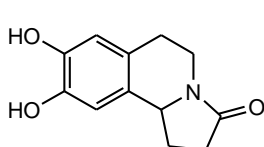
Xin et al (2008)

Figure 2. Compounds isolated from *P. oleracea*

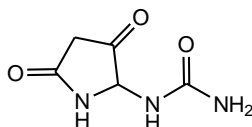


		R	R ₁	R ₂
P13	oleracein A	H	H	OH
P14	oleracein B	H	OCH ₃	OH
P15	oleracein C	H	H	glucopyranose
P16	oleracein D	H	OCH ₃	glucopyranose
P18	oleracein F	CH ₃	OCH ₃	OH
P19	oleracein G	CH ₃	H	OH

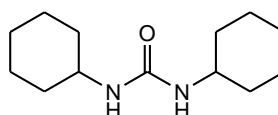
Xiang et al. (2005); Liu. et al.(2011)



P17 oleracein E



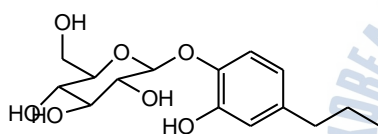
P20 allantoin



P21 N,N'-dicycloheptylurea

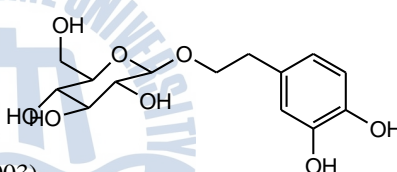
Xiang et al. (2005)

Rasheed et al. (2004)

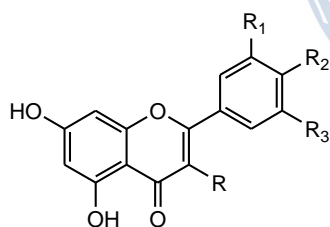


P22

Seo et al (2003)

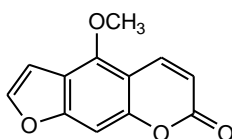


P23

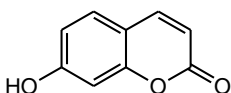


P24	R, R ₂ =OH, R ₁ , R ₃ =H	kaempferol
P25	R ₂ =OH, R, R ₁ , R ₃ =H	apigenin
P26	R ₁ , R ₂ , R ₁ =OH, R ₃ =H	quercetin
P27	R ₁ , R ₂ =OH, R, R ₃ =H	luteolin
P28	R, R ₁ , R ₂ , R ₃ =OH,	myricetin

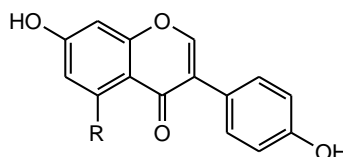
Xu et al (2006)



P29 bergapten



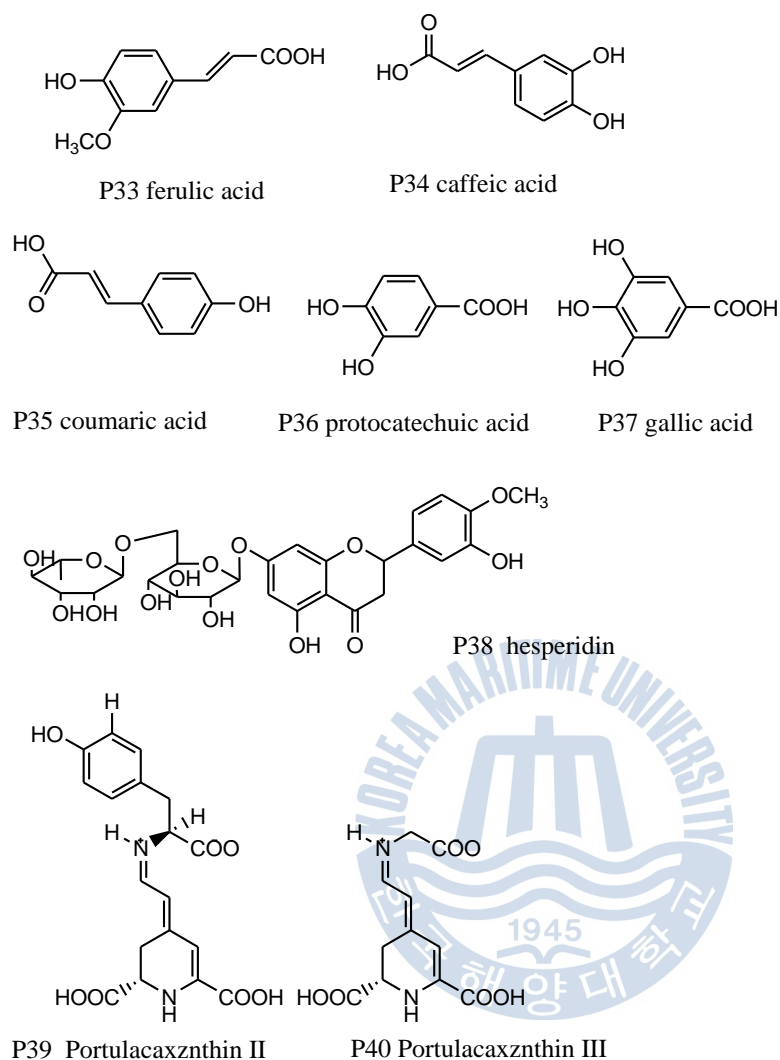
P30 umbelliferone



P31 daidzein R=H
P32 genistein R=OH

Xiang et al. (2005)

Figure 2. (continued)



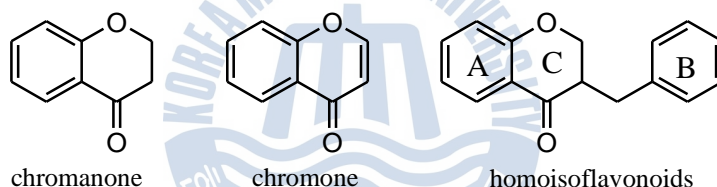
Strack et al 2003

Figure 2. (continued)

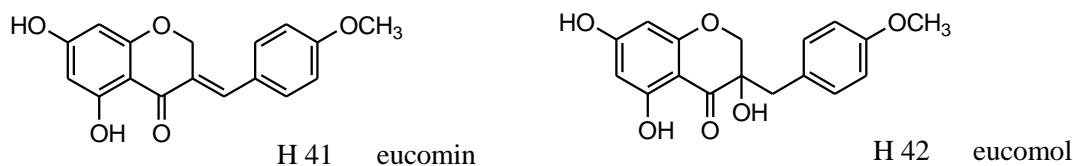
1.4. Homoisoflavonoids

1.4.1. Homoisoflavonoids 의 특징과 생리활성

Homoisoflavonoid 는 flavonoids 의 한종류로서 C6-C3-C6 의 구조를 가지는 oxygen heterocycles 이다. Flavonoids 의 A-B-C ring 구조를 가지며 B ring 과 C ring 사이에 $-CH_2-$ group 이 추가되어 있는 형태로 기본적으로 16 개의 탄소 골격을 가진다. 또한 homoisoflavonoid 는 chromane system 인 chromone 과 chromanone 의 3 번 탄소에 benzyl 또는 benzylidine group 이 결합되어 있는 형태임을 알수 있다(Shaikh et al 2011; Kirkiacharian et al 1984; Adinolfi et al 1986).



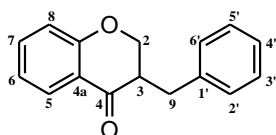
Homoisoflavonoids 로서 처음 분리된 화합물은 eucomin 과 eucomol 로서 1967 년 *Eucomis bicolor* BAK(Liliaceae)의 구근에서 Bohler 와 Tamm (1967)에 의해 분리되었다.



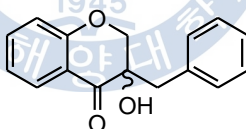
이를 시작으로 *Eucomia*, *Muscomis*, *Scilla*, *Ophiopogon*, *Ledebouria* 속등에서 다양한 homoisofalvonoid 화합물들이 많이 분리되었고(Jain et al. 1978; Adinolfi et al. 1984, 1986, 1987, 1989; Bangani et al. 1999; Crouch

et al. 1999), 이 이외에도 *Liliaceae* 과의 *Chlorophytum*, *Disporopsis*, *Polygonatum* 속에서도 보고되었다(Donnell et al. 2006; Nguyen et al. 2006; Li-hong et al. 2009).

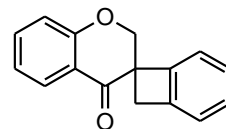
Homoisoflavonoids 의 구조는 3-benzyl-4-chromanone 의 형태가 가장 많이 발견되었으며, 이외에도 3 번 탄소에 hydroxy group 이 치환된 형태인 3-hydroxy-3-benzyl-4-chromanones 이 존재하며, 3 번 탄소와 C-ring 의 benzyl 결합사이의 이중결합이 있는 3-benzylidene-4-chromanone 이 존재한다. 이들은 이중결합의 conformation 에 따라 (Z)와 (E) 형태로 구분되며 주로 (E)형이 많이 발견되었다. Homoisoflavonoids 의 특이한 구조로서 scillascillin-type homoisoflavonoids 가 존재하며, 이들은 B-ring 과 C-ring 연결사이에 3-spirocyclobutene ring system 을 가지는 것이 특징이다(Koorbanally et al, 2006).



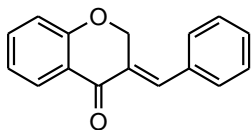
3-benzyl-4-chromanone



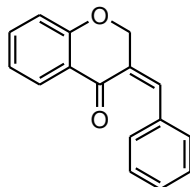
3-hydroxy-3-benzyl-4-chromanone



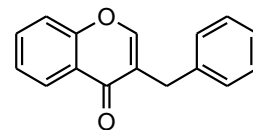
scillascillin-type homoisoflavonoids



(E)-3-benzylidene-4-chromanone



(Z)-3-benzylidene-4-chromanone



3-benzyl-4-chromone

3-Benzyl-4-chromanone 형태로써 가장 잘 알려진 화합물은 methyllophiopogonamone A, B, ophiopogonanone B, C, D, E, F disporopsin,

그리고 6-formyl-isoophiopogonanone A이 있다(Chang et al. 2002; Kaneda et al. 1980; Tada et al. 1980a; Nguyen et al. 2006) 그 외에도 methylophiopogonones A와 B, ophiopogonones A, B 및 C, isoophiopogonone A, 2'-hydroxy-methylophiopogonone A, scillascillin 등(Kuomo et al. 1973; Tada et al. 1980a Tada et al. 1980b; Watanabe et al. 1985) 무수히 많은 화합물들이 보고되었다. 최근에는 A-ring에 terpenoid 가 결합된 새로운 형태의 ledebourin A, B, C가 분리되었으며(Calvo 2009a) 또한 7번 탄소에 당이 결합된 7-O-[α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -glucopiranosyl]-5-hydroxy-3-(4-methoxybenzyl)-chroman-4-one과 7-O-[α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -glucopiranosyl]-5-hydroxy-3-(4'-hydroxybenzyl)-chroman-4-one 보고되었다(Calvo 2009b).

Table 1. Chemical structures of 3-benzyl-4-chromanone derivatives

No	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'	Ref.
P43	-OH	-CH ₃	-OH	-OCH ₃	-H	-H	-OH	-H	-H	Arch Pharm Res 2010
P44	-OH	-CH ₃	-OH	-CH ₃	-H	-H	-OH	-H	-H	Huang et al 1997
P45	-OH	-CH ₃	-OH	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Arch Pharm Res 2010
P46	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-H	-H	-OH	-OCH ₃	-H	
P47	-OH	-CH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OH	-OH	-H	-H	Asano et al, 1993
P48 methylophiopogonanone B	-OH	-CH ₃	-OH	-CH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Tada et al 1980a
P49	-OH	-CHO	-OH	-CH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Kaneda et al., 1980
P50	-OH	-CH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	Anh et al 2003
P51	-OH	-CH ₃	-OH	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-OH	-H	-H	Anh et al 2003
P52	-OH	-CH ₃	-OH	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	Anh et al 2003
P53	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OH	-H	-H	Amschler et al 1996

P54	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-OH	-H	-H	-OH	-H	-H	Adinolfi et al 1985
P55	-OH	-CH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	Chang et al. 2002
ophiopogonane E										
P56	-OH	-CH ₃	-OCH ₃	-CH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Lin et al 2010
P57	-OH	-CH ₃	-OH	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Y. Qian et al. 2010
P58	-OH	-CH ₃	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-H	Y. Qian et al. 2010
P59	-OH	-OCH ₃	-OH	-CH ₃	-H	-H	-OH	-H	-OH	Li-hong et al 2009
P60	-OH	-CH ₃	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H	-OH	Li-hong et al 2009
P61	-OH	-OCH ₃	-OH	-CH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Li-hong et al 2009
P62	-OH	-CH ₃	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Canarda et al 1983
P63	-OH	-CH ₃	-OH	-CH ₃	-H	-H	-OH	-H	-H	Heuang et al 1997
P64	-OH	-CH ₃	-OH	-OCH ₃	-H	-H	-OH	-H	-H	Vastano et al 2002
P65	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	Nguyen et al
disporopsin										
P66	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Mutanyatta et al. 2003
P67	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Mutanyatta et al. 2003
P68	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Mutanyatta et al. 2003
P69	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Mutanyatta et al. 2003
P70	-OH	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OH	-H	-H	Moodley et al 2006
P71	-OH	-H	-OH	-OCH ₃	-H	-H	-OH	-H	-H	Moodley et al 2006
P72	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-OH	-H	-H	Silayo et al 1999
P73	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OCH ₃	-H	-H	Silayo et al 1999
P74	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OH	-OCH ₃	-H	-H	Silayo et al 1999
P75	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-H	Korbanally et al 2006
P76	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Silayo et al 1999
P77	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	Silayo et al 1999
P78	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Silayo et al 1999
P79	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Sidwell and Tamm, 1970
P80	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OH	-OCH ₃	-H	-H	Bangania et al 1999
P81	-OCH ₃	-CH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	Chang et al. 2002
ophiopogonane F										
P82	-OCH ₃	-CH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	Anh et al 2003
P83	-OCH ₃	-CH ₃	-OH	-CHO	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Lin et al 2010
P84	-H	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	O' Donnell et al 2006
P85	-OCH ₃	-OCH ₃	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Korbanally et al 2006
P86	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OH	-H	-H	Mutanyatta et al. 2003
P87	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Silayo et al 1999
P88	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Silayo et al 1999
P89	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Silayo et al 1999

P90	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OH	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Silayo et al 1999
P91	-OH	-H	-H	-H	-H	-OH	-OCH ₃	-H	-H	Crouch et al 1999
P92	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Bangania et al 1999
P93 methylophiopogonamone A	-OH	-CH ₃	-OH	-CH ₃	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Tada et al 1980a
P94	-OH	-CH ₃	-OH	-H	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Tada et al 1980b
P95 6-formyl-isophiopogonanone A	-OH	-CHO	-OH	-CH ₃	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Kaneda et al, 1980
P96 ophiopogonanone C	-OH	-CH ₃	-OH	-CHO	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Chang et al. 2002
P97 ophiopogonanone D	-OCH ₃	-CH ₃	-OH	-CHO	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Chang et al. 2002
P98	-OH	-CH ₃	-OH	-OCH ₃	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Lin et al 2010
P99	-OH	-CH ₃	-OCH ₃	-CH ₃	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Lin et al 2010
P100	-OH	-CHO	-OH	-CH ₃	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Lin et al 2010



Table 2. Chemical structures of 3-benzylidene-4-chromanone derivatives

No.	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'	Ref.
P101	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Bangani et al 1999
P102	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Silayo et al 1999
P103	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Silayo et al 1999
P104	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Silayo et al 1999
P105	-OH	-OH	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Silayo et al 1999
P106	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Bohler, P and Tamm 1971
P107	-OH	-H	-OH	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Finckh and Tamm 1967
P108	-OCH ₃	-H	-OH	-H	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Heller et al. 1976
P109	-OH	-H	-OH	-OCH ₃	-H	-H	-OH	-H	-H	Finckh and Tamm 1967
P110	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H	-H	Mas ˇterova et al. 1991.
P111	-OCH ₃	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H	-H	Mas ˇterova et al. 1991
P112	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OH	-OH	-H	-H	Mas ˇterova et al. 1991

Table 3 Chemical structures of scillascillin-type homoisoflavonoids

No.	5	6	7	8	3'	4'	5'	Ref
P 113	-OH	-H	-OH	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	Mutanyatta et al. (2003) N (10)
P 114	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	Mutanyatta et al. (2003) N (11)
P 115	-OH	-H	-OH	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	Kuomo et al 1973
scillascillin								
P 116	-OH	-H	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	Adinolfi et al 1987

Table 4 Chemical structures of 3-benzyl-4-chromone

No.	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'	Ref.
P117 methylophiopogonone B	-OH	-CH ₃	-OH	-CH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Tada et al 1980a
P118 opiopogonone B	-OH	-CH ₃	-OH	-H	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Tada et al 1980b
P119 demethylisoophiopogonone B	-OH	-H	-OH	-CH ₃	-H	-H	-OH	-H	-H	Tada et al 1980b
P120	-OH	-CH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OH	-OH	-H	-H	Watanabe et al 1985
P121	-OH	-CH ₃	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Watanabe et al 1985
P122	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Watanabe et al 1985
P123 6-aldehydo-isoophiopogonone B	-OH	-CHO	-OH	-CH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Zhu et al 1987
P124	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Silayo et al 1999
P125	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	Silayo et al 1999
P126	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	Silayo et al 1999
P127	-OH	-CH ₃	-OH	-H	-OH	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Asano et al, 1993
P128	-OH	-H	-OH	-CH ₃	-OH	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Asano et al, 1993
P129 methylophiopogonone A	-OH	-CH ₃	-OH	-CH ₃	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Tada et al 1980a,
P130 ophiopogonone A	-OH	-CH ₃	-OH	-H	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Tada et al 1980b
P131 isoophiopogonone A	-OH	-H	-OH	-CH ₃	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Tada et al 1980b
P132 2'-hydroxy-methylophiopogonone A	-OH	-CH ₃	-OH	-CH ₃	-OH	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Watanabe et al 1985
P133 6-aldehydo-isoophiopogonone A	-OH	-CHO	-OH	-CH ₃	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Zhu et al 1987
P134 ophiopogonone C	-OH	-CH ₃	-OH	-CHO	-H	-O-CH ₂ -O-		-H	-H	Chang et al. 2002

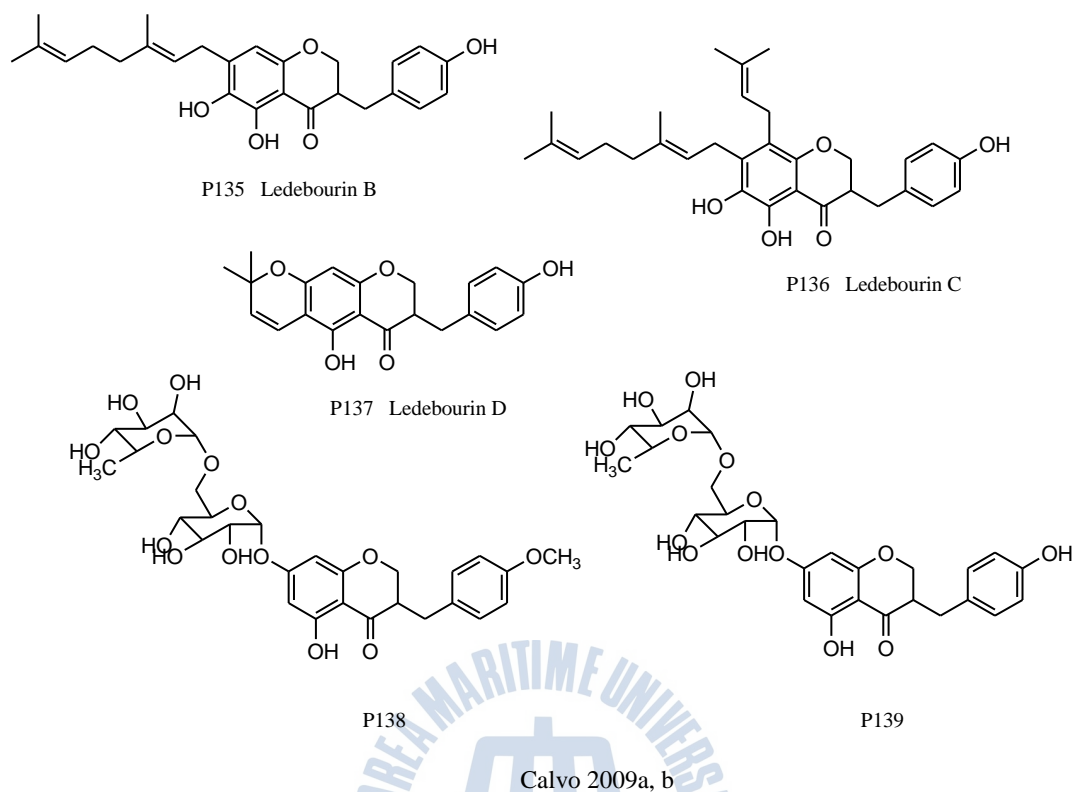


Figure 3. A new type of homoisoflavonoids recently isolated

Homoisoflavonoids 는 다양한 생물학적 활성을 가지며, antifungal, hypocholesterolemic, antimutagenic, antiviral, anti-inflammatory, antioxidant, platelet anti-aggregating activities 등의 활성이 보고되었다 (Kirkiacharian et al. 1987; Wall et al. 1989; Anschler 1996; Desideri et al. 1997; Quaglia 1999). 최근에 천연물질보다 합성하여 얻어진 homoisoflavonoids 유도체에 대한 활성이 보고되었는데, Siddaiah 등(2006)에 의해 합성된 7-hydroxy-3-[(3,4,5-trihydroxyphenyl)methylene]chromano-4-one 이 합성항산화제인 BHA 나 BHT 보다 높은 항산화 활성을 나타내었으며, 5-lipoxygenase 에서도 대조군으로 사용된 nordihydroguaiaretic acid 보다 높은

활성을 나타내었다. 7-Hydroxy-3-(4-methoxybenzylidene)chroman-4-one (bonducellin) 또한 항 염증 효과를 나타내었다(Rao et al. 2005).

본 연구에서는 쇠비름에서 분리한 homoisoflavonoids 외에도 합성을 통해 분리된 화합물의 대량 확보와 새로운 물질의 합성을 시도하여 높은 활성을 가지는 화합물을 얻고자 한다.

1.4.2. Homoisoflavonoids 의 합성

Homoisoflavonoids 는 Farkas 등(1970)에 의해 eucomin 과 eucomol 의 합성을 시작으로 활발히 연구되어 왔다. Homoisoflavonoids 는 크게 두가지 형태로 합성될 수 있다. Homoisoflavonoids 의 구조는 chromanone 골격에 benzyl group 이 결합된 형태로서, chromanone 합성을 통해 benzyl aldehyde 와 반응하여 얻을 수 있으며(i), (Farkas et al. 1970), 또한 homoisoflavonids 의 전구체인 dihydrochalcone 형태를 합성하여 B-ring 을 형성하는 반응(ii)을 통해 효과적으로 합성할 수 있다(Farkas et al. 1971; Chatterjea et al. 1979).

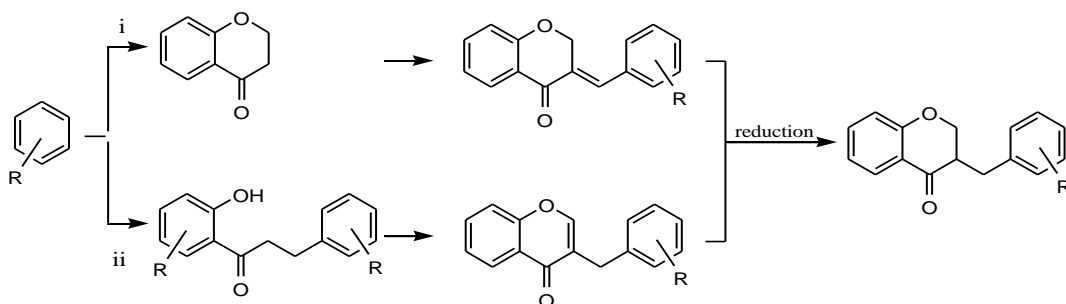


Figure 4. Synthesis of 3-benzyl-4-chromanones.

(ii)의 방법은 phenol 과 β -(phenyl)propionitrile 을 사용하여 쉽게 dihydrochalcone 을 합성 할 수 있으며 생성된 화합물은 ethyl formate 와 metal sodium 과 반응시켜 3-benzylchromon 을 생성한다. Farkas 등 (1971)의 방법은 chromone 형태의 화합물을 합성하기에는 효과적이지만 다양한 형태의 homoisoflavonoids 을 합성할 수 없는 한계가 있다.

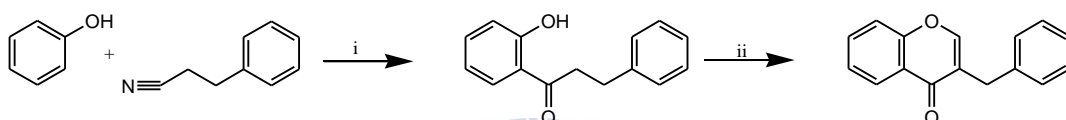


Figure 5. Reagents and conditions: (i) β -(phenyl)propionitrile, zinc chloride HCl gas, dry ether, 0°C, 16h; (ii) ethyl formate, Na, rt, 16h

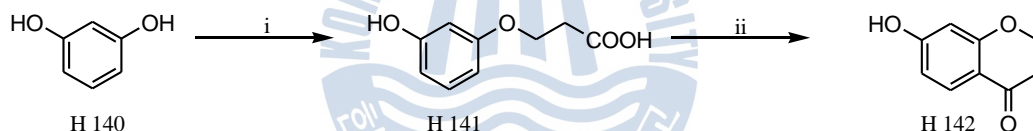
반면에 (i)의 반응은 3-benzylidene-4-chromanone 을 형성하므로써 isomer 인 (E), (Z)형 을 합성할 수 있으며, double bond 를 hydrogenation 하므로써 다양한 화합물을 얻을 수 있는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 쇠비름에서 분리된 homoisoflavonoids 를 얻고 그 외 다양한 화합물을 얻고자 (i) mechanism 을 통한 합성을 시도하고자 하였다.

Chromanone 합성

Chromanone 합성은 일반적으로 phenolic compounds 를 초기 반응물질로 사용하여 시작되며, 주로 3-bomnpropionic acid(Siddaiah et al 2006)와 3-chloropropionic acid(Foroumadi et al 2007; Koch and Biggers 1994)가

사용되고 반응물에 따라 그 합성방법이 달라진다. 먼저, Siddaiah 등(2006)의 방법에 의하면 NaH 를 염기로 사용하여 resorcinol(3-methoxyphenol, H140)과 3-bromopropionic acid 를 반응시켜 합성된 3-phenyloxypropionic acid(H141)에 polyphosphoric acid(PPA)를 첨가여 고리를 연결하였다. 두 번째 반응은 Freidel-Crafts 아실화 반응으로 Koch 와 biggers (1994)에 따르면 resorcinol(3-methoxyphenol, H140)과 trifluoromethanesulfonic acid(3 equiv)를 첨가하여 Freidel-Crafts 반응 생성물인 H143 를 얻었으며, 2 M NaOH 와 반응시켜 고리를 연결함으로써 2-hydroxy-4-chromanone 을 효과적으로 합성하였으며, 61%에 달하는 높은 수득률을 보였다.

(A) Siddaiah et al (2006)



(B) Foroumadi et al (2007)

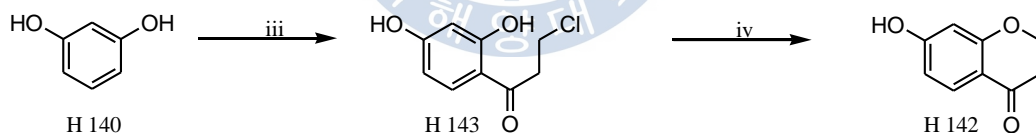


Figure 6. Reagents and conditions: (i) Bromopropionic acid, NaH, DMF, 70–80°C, rt, 16h, 30%; (ii) PPA, 80°C, 4h, 46%; (iii) 3-chloropropionic acid, CF₃SO₃H(3 equiv), 80°C, 30 min; (iv) 2.0 M NaOH, 61%.

3-Benzylidene-4-chromanone 합성

3-Benzyliene-4-chromanone 의 합성은 위에서 생성된 2-hydroxy-4-chromanone(H142)과 다양한 benzaldehyde 를 반응시켜 얻을 수 있다. 합성방법은 산촉매와 염기촉매 방법에 의해서 이루어질 수 있으며, 각각의 방법은 Siddaiah 등(2006)과 Foroumadi 등(2007)에 잘 보고되고 있다. Siddaiah 등에 의한 방법은 염기인 piperidine 을 사용한 방법으로 용매가 없는 상태에서 빠르고 간단하게 homoisoflavonoids 를 합성할 수 있다. 두 번째 방법은 HCl gas 를 이용한 방법으로 2-hydroxy-4-chromanone(H142)과 benzaldehyde, acetic acid 를 첨가하여 열음에 의해 냉각된 상태에서 3 분간 HCl gas 를 통과시킨 뒤, 실온에서 24 시간동안 반응시켜 homoisoflavonoid 를 얻을 수 있다(Foroumadi et al 2007).

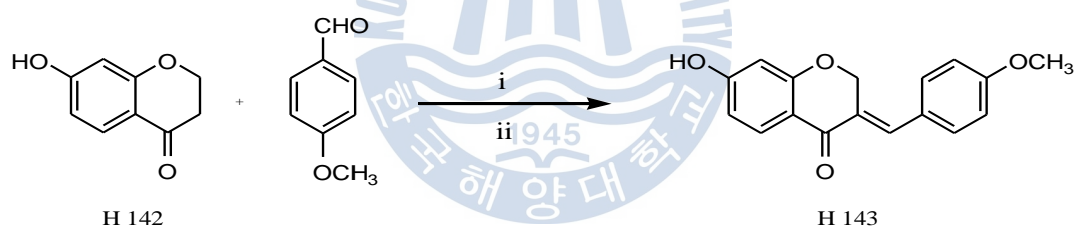


Figure 7. Reagents and conditions: (i) Piperidine, 3-methoxybenzaldehyde, 80°C, 2h, 43%; (ii) HCl gas, CH₃COOH, 3-methoxybenzaldehyde.

본 연구에서는 Siddaiah 등(2006)의 방법을 응용하여 homoisoflavonoids 를 합성하였다. Phloroglucinol(3,5-dihydroxyphenol)과 iodomethane 을 이용하여 3,5-dimethoxyphenol 을 합성하였으며, 계속해서 3-bromopropionic acid 를 이용한 반응 및 PPA 를 이용한 고리화 반응을 수행하였다. 그 후,

piperidine 을 사용하여 chroman-4-one 과 2-methoxybenzaldehyde 를 반응시켜 5,7-methoxyl-3-(2-methoxybenzylidene)chroman-4-one 을 성공적으로 합성하였다.



2. 재료 및 방법

2.1. 재료

실험에 사용된 쇠비름(*P. oleracea*)는 전국각지에서 구입하여 사용하였으며, 파배기모자반(*S. siliquastrum*)은 제주도에서 직접채집하여 응달에서 건조후 - 25 ℃에서 보관하였다. 모든 시료는 실험에 사용되기전 분쇄하여 추출하였다.



(a) *P. oleracea*

(b) *S. siliquastrum*

Figure 8. Photographs of (a) *P. oleracea*, and (b) *S. siliquastrum*.

2.2. 시약

2.2.1. 분리 및 합성

Column packing materials 은 RP 18(YMC-GEL ODS-A, 12 nm, S-75 μ m)을 사용하였으며, TLC plate 는 Silica gel 60 F254s(0.5 mm, Merck)를 사용하였으며, spray reagent 는 5% H_2SO_4 와 vanillin-sulfuric acid reagent 를 분사하여 발색되는 것을 관찰하였다. 추출 및 분획, column chromatography 에 사용한 모든 용매는 1 급 시약을 증류하여 사용하였다. HPLC 에 사용한 column 은 YMC pack ODS-A(250 \times 10 mm, S 5 μ m, 12 mm)을 사용하였고, guard column(7.5 \times 4.6 mm, Alltech)을 사용하였다. NMR 측정 시

사용한 용매는 CDCl_3 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA, deuterium degree 99.8%), CD_3OD (Merck. deuterium degree 99.95%)를 사용하였다.

합성에 사용된 시약은 phloroglucinol(Sigma, China), sodium hydride(Sigma, USA), N,N-dimethylformamide(DMF, Aldrich, USA), piperidine(Aldrich, USA), 2-methoxybenzaldehyde(Aldrich, USA), 3-bromopropionic acid(TCI-GR, Japan)를 사용하였다.

2.2.2 활성

세포배양에 필요한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), 0.05% Trypsin-0.02% EDTA 와 100 units/mL penicillin-streptomycin 은 GIBCO 사(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. ROS 측정에 사용된 DCFH-DA 는 Molecular Probes Inc.(sigma, OR, USA)로부터 구입하였다. Matrix metalloproteinase (MMP) 발현의 측정에 사용된 12-myristate- 13-acetate(PMA)는 Sigma 사에서 구입하였으며, MMP-2, 9 과 GAPDH 은 R&D systems Inc.에서 구입하여 사용하였다 전기영동에 사용된 powder 형태의 agar 는 Juse Chemical, EtBr(ethidium bromide)는 Bioneer 사에서 구입하여 사용하였다.

2.2.3. 기기

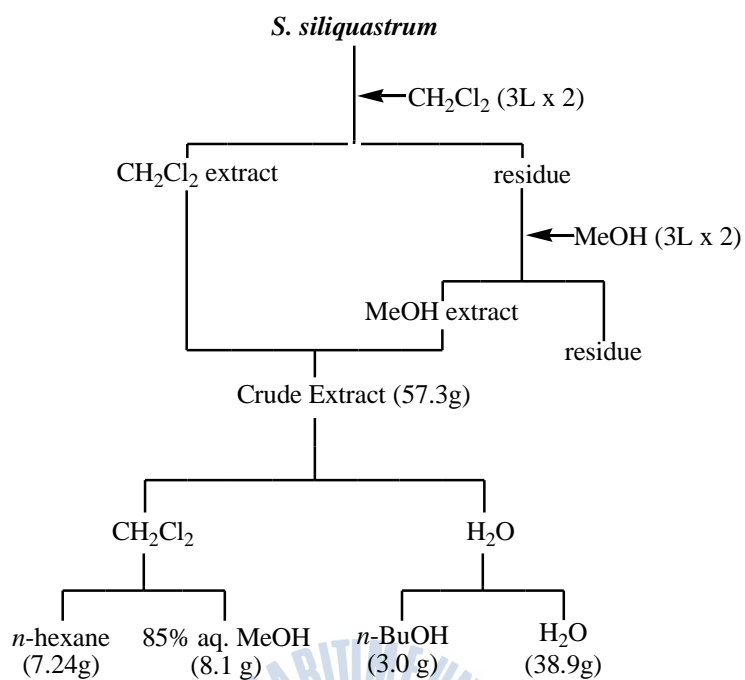
^1H -NMR 과 ^{13}C -NMR, two-dimensional NMR 실험은 모두 Varian NMR 300 spectrometer(Varian Mercury 300, USA)를 사용하였고, UV-Vis

spectrophotometer(Thermo Spectronic, England)와 polarimeter (Perkin Elmer 341, U.S.A.)를 사용하여 구조 결정하였다. Victor3 multilabel plate reader(PerkinElmer, MA, USA)가 항산화 활성 측정에 사용되었으며 그 외에 rotary evaporator(EYELA, JAPAN), vacuum pump, pH meter, water bath, pipet(JBM-pipet), 여과기 등을 사용하였다. 세포배양은 5% CO₂ incubator(Forma Scientific, Japan)를 사용하였고 유전자는 PCR(Biorad, USA)을 사용하여 유전자 증폭하였다.

2.3. 파배기모자반(*S. siliquastrum*)의 추출 및 분리

2.3.1. 추출

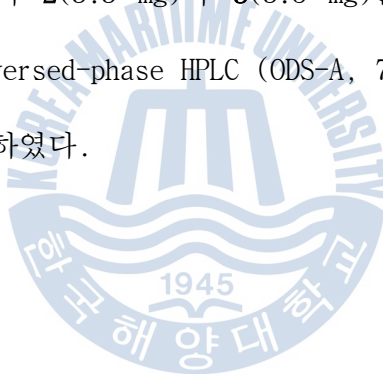
파배기 모자반은 acetone 과 methylene chloride 를 1:1 비율로 섞은 혼합용액(3L x 2)을 사용하여 24 시간 방치한 후 여과하여 추출액을 얻었으며, 이 과정을 2 번 반복하였다. 남은 잔사에 동량의 MeOH 을 첨가하여 동일 과정을 통해 추출액을 얻었으며, 추출액은 감압농축하여 조추출물을 획득하였다. 조추출물은 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O 분획물을 각각 7.24 g, 8.05 g, 3.02 g, 38.94 g 얻었다 (Scheme 1).

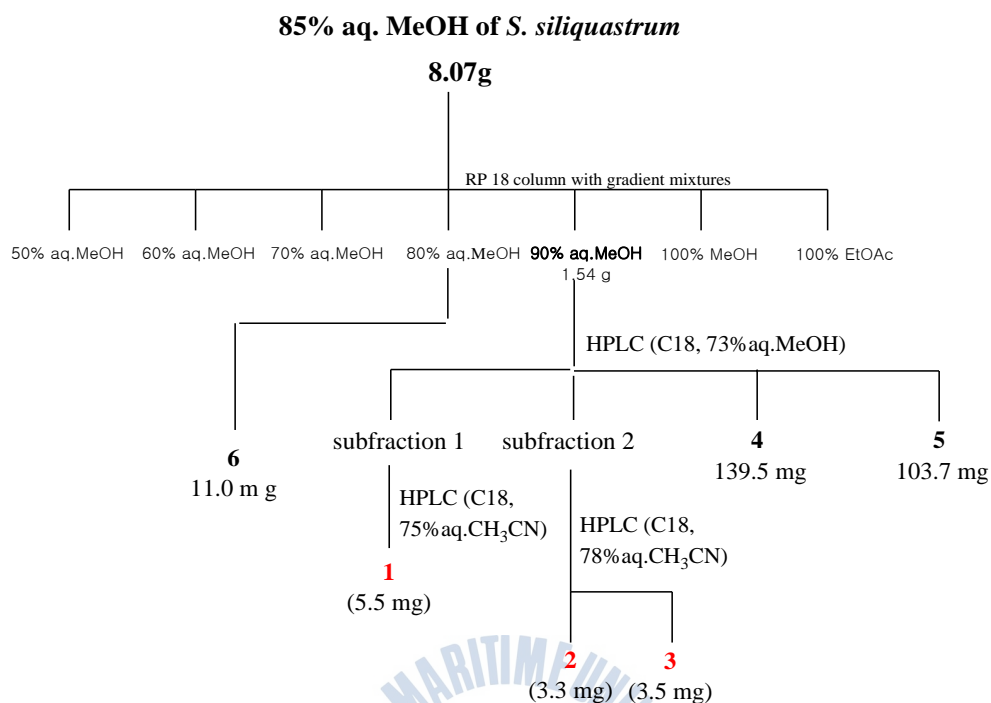


Scheme 1. Preparation of crude extraction and its solvent fractions from *Sargassum siliquastrum*

2.3.2 모자반의 활성 성분 분리

85% aq.MeOH 층은 C₁₈ reversed-phase vacuum flash chromatography 를 사용하여 7 개의 fraction(50%, 60%, 70%, 80%, 90% aq. MeOH 그리고 100% MeOH, 100% EtOAc)으로 나누었다. 그 중에 90% aq.MeOH fraction 을 reversed-phase HPLC (ODS-A, 87% aq. MeOH)로 분리하여 알려진 화합물 **4**(139.5 mg)와 **5**(103.7 mg)를 분리하였다. 그리고 HPLC 로 얻어진 subfraction 1 을 다시 reversed-phase HPLC (ODS-A, 75% aq.CH₃CN)를 사용하여 **1**(11.6 mg)를 분리하였다. 유사하게 HPLC 로 얻어진 subtraction 2 를 다시 reversed-phase HPLC (ODS-A, 78% aq.CH₃CN)로 분리하여 **2**(3.3 mg)와 **3**(3.5 mg)을 순수하게 얻었다. 80% aq.MeOH fraction 을 reversed-phase HPLC (ODS-A, 77% aq. MeOH)로 분리하여 알려진 화합물 **6**을 분리하였다.



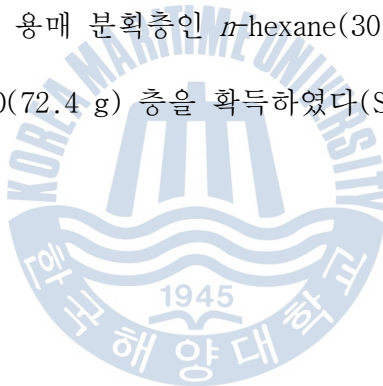


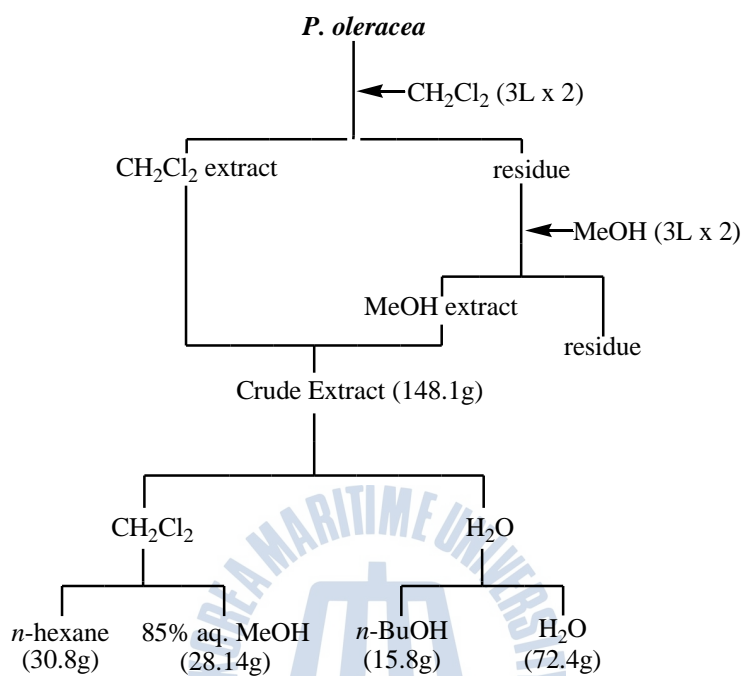
Scheme 2. Isolation of the compounds **1-6** from *S. siliquastrum*.

2.4. 쇠비름(*P. oleracea*)의 추출 및 분리

2.4.1. 추출

Powder 형태의 쇠비름은 methylenle chloride(CH_2Cl_2)(3 L x 2)를 첨가하여 실온에서 24 시간 추출한 뒤에 여과하여 감압농축(EYELA, N-N series, Japan)하였으며, 남은 잔사에 methanol(MeOH)(3 L x 2)을 첨가하여 위와 동일한 방법으로 추출하여 농축하였다. 얻어진 두 추출물은 혼합하여 CH_2Cl_2 와 water 를 이용하여 분획하였으며, CH_2Cl_2 층은 *n*-hexane 과 85% aqueous methanol(85%aq.MeOH)로 다시 분획하였고, water 층 또한 *n*-butanol(BuOH)과 H_2O 으로 분획하여 4 개의 용매 분획층인 *n*-hexane(30.0 g), 85% aq.MeOH(28.14 g), *n*-BuOH(15.8 g)과 H_2O (72.4 g) 층을 획득하였다(Scheme 3).

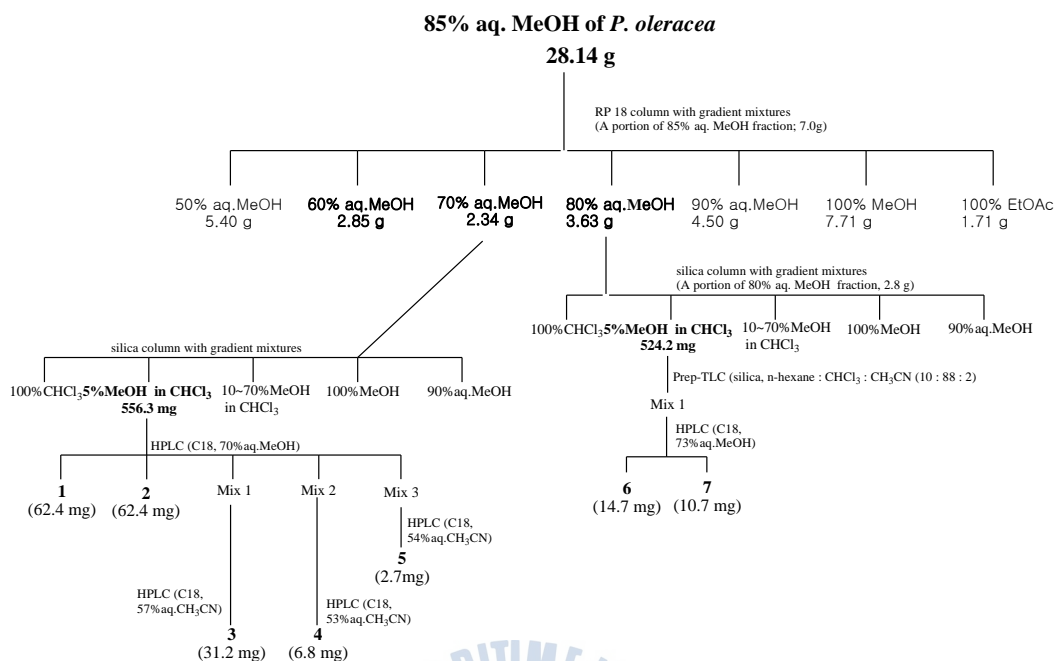




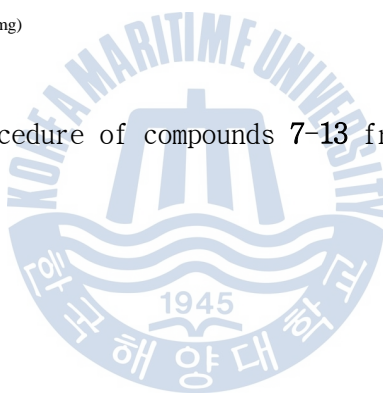
Scheme 3. Procedure of extraction and various fractions from *P. oleracea*

2.4.2. 화합물의 분리

85% aq.MeOH(28.4 g) 층은 C₁₈ reversed-phase vacuum flash chromatography 를 사용하여 7 개의 fraction[50%, 60%, 70%, 80%, 90% aq. MeOH 그리고 100% MeOH, 100% ethyl acetate 으로 나누었다. 그 중 70% aq.MeOH fraction 을 silica normal-phase column chromatography 를 사용하여 11 개의 subfraction(100% CHCl₃, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70% MeOH in CHCl₃, 100% MeOH, 10% aq.MeOH)을 획득하였다. 5% MeOH in CHCl₃ subfraction(556.3 mg)은 reversed-phase HPLC (ODS-A, 70% aq. MeOH)을 사용하여 7(62.4 mg)과 8(18.4 mg)을 분리하였으며, 얻어진 mixtures 으로부터 reversed-phase HPLC[ODS-A, 57% / 53% / 54% aq.acetonitrile(CH₃CN)]하여 9(31.2 mg), 10(6.8 mg), 11(2.7 mg)를 분리하였다(Scheme 4). 80% aq.MeOH fraction 을 silica normal-phase column chromatography 를 사용하여 위와 동일하게 11 개의 subfraction(100% CHCl₃, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70% MeOH in CHCl₃, 100% MeOH, 10% aq.MeOH)으로 나뉘었으며, 그 중 5% MeOH in CHCl₃ subfraction(524.2 mg)을 preparative TLC[silica, *n*-hexane : CHCl₃ : CH₃CN (10 : 88 : 2)]하였다. 얻어진 mixture 1(239.0 mg)를 reversed-phase HPLC(ODS-A, 73% aq. MeOH)하여 12(14.7 mg)과 13(10.7 mg)을 얻었다.



Scheme 4. Isolation procedure of compounds **7-13** from *P. oleracea*



2.5. Homoisoflavonoids 합성

2.5.1. 3,5-dimethoxyphenol 합성 및 분리

5 g 의 3,5-dihydroxyphenol(phloroglucinol, 36.9 mmol)을 10 mL 의 DMF 에 녹인후, 30 mL DMF 에 녹인 sodium hydride(NaH, 3.4 g, 50%, 79.2 mmol)를 첨가하여 30 분동안 실온에서 교반하고, 과량의 CH_3I 를 첨가하여 실온에서 수시간 교반하였다. 반응이 종결되면 MeOH 을 첨가하고, EtOAc(50 mL x 2)로 추출한 뒤, 증류수(10 mL x 2)와 brine(10 mL)으로 씻어준다. 다음 Na_2SO_4 로 탈수시켜 여과한 후에 농축하였다. 얻어진 반응물은 silica column chromatography 법을 이용하여 10 % EtOAc in Hexane 층에서 화합물을 획득하였으며, 순수한 화합물을 얻기 위해 normal-phase HPLC(ODS-silica, 10% EtOAc in hexane)를 실시하여 순수한 화합물 3,5-dimethoxyphenol, 550 mg(11%)을 획득하였다.

2.5.2. 3-(3,5-dimethoxyphenoxy)propanoic acid 합성 및 분리

2.24 g 의 3,5-dimethoxyphenol(14.5 mmol, 5 mL DMF)와 2 g 의 NaH(41 mmol, 20 mL DMF)를 혼합하여 ice-water 에서 30 분간 교반하였다. 30 분후, 3.37 g 의 3-bromopropanoic acid(21.3 mmol, 5 mL DMF)를 첨가하여 실온에서 16 시간 동안 교반하였다. 반응이 종결되면 소량의 MeOH 를 첨가하고 10% HCl 를 사용하여 acidify 시킨뒤, EtOAc(30 mL x 2)로 추출하였다. 추출액은 증류수(20 mL)와 brine(20 mL)를 첨가하여 씻은 후에 Na_2SO_4 로 탈수 시킨뒤 여과하여 농축하였다. 3-(3,5-dimethoxyphenoxy)propanoic acid 은 silica

column chromatography 를 통해 30 % EtOAc in Petroleum ether 층에서 순수한 화합물 1.04 g(46%)을 분리하였다.

2.5.3. 5,7-dimethoxychroman-4-one 합성 및 분리

1.04 g 의 3-(3,5-dimethoxyphenoxy)propanoic acid 에 5 g 의 polyphosphoric acid(PPA)를 첨가하여 70~75℃에서 2 시간 동안 교반한 후에 실온에서 2 시간동안 반응시켰다. 반응 종결 후, ice-cold 증류수를 희석하고 ether(30 mL x 2)로 추출하였다. 추출액은 10% sodium carbonate(20 mL), 증류수(20 mL)와 brine(20 mL)으로 순차적으로 씻어 주었다. 마지막으로 Na₂SO₄로 탈수 시킨 뒤 농축하여 480 mg(47%)의 5,7-dimethoxychroman-4-one 를 획득하였다.

2.5.4. (*E*)-5,7-dimethoxy-3-(2-methoxybenzylidene)chroman-4-one 합성 및 분리

480 mg 의 5,7-dimethoxychroman-4-one(2.3 mmol)와 476.5 mg 의 2-methoxybenzaldehyde (3.5 mmol)를 혼합한 후에 10 방울 정도의 piperidine 을 첨가하여 110℃에서 2~5 시간 반응시켰다. 반응이 종결되면 식힌 후, 증류수를 첨가하여 희석한 뒤, 10% HCl 로 acidify 하였다. EtOAc(30 mL x 2)로 추출하고 증류수, brine 으로 씻은 후 Na₂SO₄ 로 탈수하여 농축하였다. *n*-Hexane:EtOAc:CH₃CN(6:3:1)를 이동상으로 prep-TLC(Silica)하여 (*E*)-5,7-dimethoxy-3-(2-methoxybenzylidene)chroman-4-one(130 mg, 32%)을 분리하였다.

2.5.5. 5,7-dimethoxy-3-(2-methoxybenzyl)chroman-4-one 합성 및 분리

130 mg 의 (*E*)-5,7-dimethoxy-3-(2-methoxybenzylidene)chroman-4-one(0.400 mmol)와 33 mg 의 $[PbCl_2(dppf)]$ (0.06mmol)를 혼합하여 질소 하에 0℃에서 교반한다. 추가적으로 6 mL 의 THF 를 첨가하여 1 시간 동안 교반하고 0.5 M 9-BBN/THF (3.9 mL/2 mmol)을 첨가하여 4 시간동안 ice 에서 반응 시킨 뒤에 실온에서 수시반 반응시킨다. 1 mL 의 MeOH 을 첨가하고 감압하여 용매를 제거한다. 농축된 플라스크에 15 mL 의 hexane 과 120 μ L 의 2-aminomethanol 을 첨가하여 흰색침전물이 생성되면 glass filter 로 제거한뒤 수차례 benzene 으로 washing 하여 농축하였다 *n*-Hexane 과 EtOAc 을 gradient 하여 silica column chromatography 하여 순수하게 5,7-dimethoxy-3-(2-methoxybenzyl)chroman-4-one (30.1 mg, 23%)을 분리하였다.

2.6. 항산화 활성 실험

2.6.1.DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, Sigma, MO, USA) 시약 2 mg 을 정확히 칭량하여 15 mL ethanol에 녹인 DPPH 원액 1.2 mL와 3 mL ethanol 그리고 0.5 mL DMSO를 동일 비율로 혼합하여 DPPH radical solution을 준비한다. 900 μ L의 DPPH radical solution과 준비된 100 μ L 시료를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 Victor3 multilabel plate reader(PerkinElmer, MA, USA)를 사용하여 518 nm 에서 흡광도를 측정하였다(Blois 1958). 시료를 첨가

하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었으며, 대조군의 UV-Vis 흡광도는 0.94 ~0.97이 되도록 조정하였다.

2.6.2. Peroxynitrite 소거 활성 측정

ONOO⁻소거 활성은 dihydrorhodamine 123(DHR 123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다(Kooy et al 1994). Dimethylformamide로 녹인 DHR 123(5 mM) stock 용액은 질소로 purge하여 -80 °C에 보관하였고, 50 mM sodium phosphate, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride를 혼합한 buffer(pH 7.4)와 100 µM DTPA(diethylenetriaminepenta acetic acid)를 혼합한 용액으로 DHR 123을 5 µM로 희석하여 실험에 사용하였다. DHR123 buffer 용액에 시료와 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5분간 방치한 뒤, Victor3 multilabel plate reader를 사용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 실온에서 1시간 동안 방치한 후 측정하였다. SIN-1은 NO·와 O₂·⁻를 동시에 발생시켜 ONOO⁻를 생성시키는 화합물로서 authentic peroxynitrite의 급속한 DHR 123의 산화와는 달리 점진적으로 산화가 일어나게 한다. 실험은 triplicate로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

2.6.3. 세포배양

인간 유래 암세포인 AGS (human gastric cancer), HT-29 (human colon cancer),

HT-1080 (human fibrosarcoma), MCF-7 (human breast cancer)와 Raw 264.7 macrophage 세포는 한국 세포주 은행으로부터 구입하여 사용하였으며, 10% FBS 와 100 μ g/mL penicillin-streptomycin 이 포함된 RPMI 1740과 DMEF 배지를 사용하여 5% CO₂ and 37 °C incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 2-3회 배지를 교환하고 6-7일 만에 PBS로 세척한 후 HT-1080과 AGS는 0.05% Trypsin-0.02 % EDTA로 부착된 세포를 분리하여 계대배양 하였고, Raw 264.7은 cell scraper로 분리하여 계대배양 하였다.

2.6.4. 세포내 활성 산소종(ROS, reactive oxygen speices)

세포의 free radical의 생성은 DCFH-DA assay로 측정하였다 (Okimotoa., 2000). HT-1080 세포를 96 well plate 2×10^4 cells/well이 되도록 분주하고 37°C, 5% CO₂배양기에서 24시간 배양하였다. PBS 완충액으로 씻은 후 20 μ M DCFH-DA을 각 well에 주입하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 20분간 pre-incubation하였다. 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 1시간 incubation한 후, DCFH-DA을 없애고 cell은 다시 PBS 완충액으로 씻은 후 500 μ M H₂O₂ 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 ex. 485 nm, em. 530 nm에서 Victor3 multilabel plate reader(PerkinElmer, MA, USA)로 측정하였다

2.6.5. TBARS법을 이용한 lipid peroxidation 측정

Lipid peroxidation의 생성정도는 thiobarbituric acid-reactive

substances (TBARS) 방법으로 측정하였다(Heath and Packer 1968). 200 μ L의 PBS-suspended Raw 264.7 세포를 일정한 농도의 시료로 각각 처리한 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 10분간 배양하였다. 세포내 산화를 유도하기 위하여 2 mM H₂O₂와 0.1 M FeSO₄로 처리한 후 37℃ 에서 10분간 반응시켰다. 반응 후, trichloroacetic acid (TCA, 10% w/v)를 처리하여 산화를 중지시키고, 동량의 TBA (1% w/v)를 첨가하여 90℃에서 30분 동안 반응시켰다. 실온에서 냉각시킨 혼합액을 원심분리 후 상등액의 흡광도를 528 nm에서 측정하였다.

2.6.6. GSH contents 측정

세포내에 축적된 GSH 함량은 thiol-staining reagent인 mBBr (monobromobiman)을 이용하여 측정하였다. 세포는 fluorescence microtiter 96-well plates에 well 당 1×10^7 cells/ml가 되도록 분주하여 24시간 배양한 후, 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 다시 37℃ 5% CO₂ incubator에서 30분간 배양하였다. 다시 각 well은 PBS 완충액으로 씻은 후 40 M mBBr(monobromobiman)를 처리하여 37℃ 5% CO₂ incubator에서 30분간 반응시킨 후 시료처리에 의한 GSH 함량의 변화를 시간별로 ex. 360 nm, em. 465 nm에서 형광 분석기로 측정하였다.

2.7. 암세포 증식억제 실험

실험에 사용된 시료에 대한 암세포 증식억제효과를 확인하기 위하여 MIT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide)] 시약을 이용하여

측정하였다. 배양된 세포는 2×10^4 cells/well이 되도록 96 well plate에 분주하여 37℃, 5% CO₂배양기에서 24시간 배양하였다. 시료를 처리한 후에 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양된 세포에 1 mg/mL의 MTT 시약을 처리하여 4시간 동안 배양하였다. Formazan이 형성되면 MTT 시약처리 배지를 제거하고 형성된 formazan 결정을 DMSO 녹여서 Victor3 multilabel plate reader(PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율(%)을 구하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

2.8. 항비만 활성 실험

2.8.1. 3T3-L1 세포의 배양 및 지방세포로의 분화 유도

3T3-L1 preadipocytes는 ATCC에서 분양받아 10% FBS, 100 units/mL penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM 배양액으로 75 T-flask를 사용하여 humid, 37℃의 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 3.3×10^3 cells/well이 되도록 6 well plate에 분주하여 배양하였으며, 세포가 confluent되고 이틀 뒤, 10% FBS, 5 µg/mL의 insulin, 0.25 µM dexamethazone, 0.5 mM IBMX가 첨가된 배지에서 48시간 동안 배양하여 분화를 유도하였다. 48시간 후 10% FBS와 5 µg/mL의 insulin만 포함된 배지와 시료를 2일 간격으로 교체하면서 6일 동안 분화를 유도하였으며, pellet과 배양액을 각각 모아 실험에 사용하였다.

2.8.2. 3T3-L1전구 지방세포에서의 세포 분화능 측정

3T3-L1의 분화능은 Oil Red O로 염색하여 측정하였다. 분화유도된 세포는 배양액을 제거하고 PBS로 세척, 10% formalin으로 10분간 고정시킨 후 Oil Red O를 처리하여 30분간 염색하였다. 염색 후에 증류수로 세척하고 세포내 지방 축적 정도를 관찰하였다. 관찰 후, 증류수를 제거하고 isopropyl alcohol로 용해하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8.3. Glycerol 분비 측정

분화유도된 세포의 배양액을 모아 free glycerol 함량을 측정하였다. Glycerol 정량은 효소 반응법을 이용하여 free glycerol reagent(Sigma, USA)를 반응시켜 측정하였다. 37℃로 pre-warmed된 free glycerol reagent 1 mL에 배양액 10 μ L를 넣어 37℃에서 15분간 incubation 시킨후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8.4. Glucose 소비 측정

Glucose의 농도는 oxidase법을 이용한 glucose kit(GLZyme사)를 이용하여 분석하였다(Choi and Kim, 2010).

2.8.5. Leptin 측정

지방세포에서 분비하는 호르몬인 leptin의 양은 배양액을 이용한 ELISA (enzyme Linked Immunosolvent Assay, R&D systems) 방법으로 측정하였다.

Leptin 항체가 coating된 96 well plate에 시료 100 μ L을 넣어 1시간 동안 배양하였다. PBS-T로 3차례 세척한 후 biotinylated goat anti-mouse leptin IgG 200 μ g/mL을 넣고 1시간 동안 상온에서 incubation한 후 다시 PBS-T로 3번 세척하였다. Avidine-HRP(horse-radish peroxidase)를 첨가하여 상온에서 1시간 30분 동안 배양한 후 3번 세척하였다. 각 well에 100 μ L의 TMB(tetramethylbenzidine dihydrochloride substrate)를 넣고 30분 동안 반응시켜 발색시킨 후, 50 μ L의 2 M H_2SO_4 를 첨가하여 반응을 종결하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8.6. 비만 관련 유전자 발현 측정

활성성분에 의한 비만관련 유전자의 mRNA 발현 정도는 RT-PCR을 이용하여 확인 하였으며 housekeeping 유전자인 GAPDH를 internal control로 사용하였다. RNA는 시료 처리된 3T3-L1 세포로부터 Trizol[®] reagent(sigma)을 사용하여 total RNA를 추출, 정량하였다. 분리된 RNA내에서 유전자 발현을 분석하기 위해 표준화방법에 따라 역전사 반응을 실시하여 cDNA를 합성하였다. 각 유전자는 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 denaturation 반응을 시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 60 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 35 cycles을 반응시켰다. 다시 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 유지시킨 후에 4 $^{\circ}$ C에서 종결하였다. PCR 산물은 1% agarose 겔에서 전기영동을 실행하여 밴드를 확인하였다.

Table 5. Sequences of primer used for RT-PCR

Gene name		Sequence
PPAR γ	Sence	5'-TTTCAAGGGTGCCAGTTTC-3'
	Ant isence	5'-AATCCTTGGCCCTCTGAGAT-3'
C/EBP α	Sence	5'-TTACAACAGGCCAGGTTTCC-3'
	Ant isence	5'-GGCTGGCGACATACAGTACA-3'
SREBP1c	Sence	5'-TGTGGCATCCTGTATCTG-3'
	Ant isence	5'-AGGGAAAGCTTTGGGGTCTA-3'
FABP-4	Sence	5'-AGACGGCCCTGATCTTCGA-3'
	Ant isence	5'-TGGACCTCACAGTTGGCTGA-3'
FATP1	Sence	5'-TGCCTCTGCCTTGATCTTTT-3'
	Ant isence	5'-GGAACCGTGGATGAACCTAA-3'
FAS	Sence	5'-TTGCTGGCACTACAGAATGC-3'
	Ant isence	5'-AACAGCCTCAGAGCGACAAT-3'
LPL	Sence	5'-TCCAAGGAAGCCTTTGAGAA-3'
	Ant isence	5'-CCATCCTCAGTCCCAGAAAA-3'
ACS1	Sence	5'-CAACCCAGAACCATGGAAGT-3'
	Ant isence	5'-CTGACTGCATGGAGAGGTCA-3'
Leptin	Sence	5'-GGATCAGGTTTGTGGTGCT-3'
	Ant isence	5'-AAGGATCCTGCACCTCACAC-3'
TNF α	Sence	5'-AGGCCTTGTGTTGTGTTCCA-3'
	Ant isence	5'-TGGGGGACAGCTTCCTTCTT-3'
HSL	Sence	5'-GAGGGACACACACACCTG-3'
	Ant isence	5'-CCCTTTCGAGCAACTTTAG-3'
Perilipin	Sence	5'-AAGGATCCTGCACCTCACAC-3'
	Ant isence	5'-CCTCTGCTGAAGGGTTATGG-3'
GAPDH	Sence	5'-CGGAGTCAACGGATTGGDCGTAT-3'
	Ant isence	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'

2.7. 통계분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산 분석(ANOVA)을 행한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균(Mean) \pm 표준편차(Standard deviation, SD)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 Statistic Analysis System v9.1(SAS Institute Inc., NC, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다.



3. 결과 및 고찰

3.1. 이차대사산물 분리 및 구조 결정

3.1.1. 파배기 모자반으로부터 활성 성분의 구조 결정(1-3)

파배기 모자반으로부터 3 개의 새로운 chromane 화합물을 분리하였으며 다음과 같은 방법으로 그들의 구조를 결정하였다. Compound 1 은 무색의 gum 형태로 분리되었으며, 분자식 $C_{27}H_{38}O_5$ 은 질량분석[HREIMS($[M]^+$ m/z 424.2609)]과 ^{13}C NMR 자료에 의해서 결정되었다. IR spectrum 측정 결과 $\nu_{max} = 1683\text{ cm}^{-1}$ 에서 강한 흡수 띠를 보여 주어 carbonyl 작용기가 존재함을 알 수 있었으며, ^{13}C NMR 스펙트럼의 δ 200.4 (C-10') 에서 나타난 신호도 이 사실을 지지하였다. δ 155 - 110 부근에서 aromatic/olefinic carbon 들로 예상되는 12 개의 신호가 나타났으며, 1H NMR 스펙트럼에서도 δ 6.31 (1H, d, $J=2.6$ Hz)과 δ 6.39 (1H, d, $J=2.6$ Hz)에서 방향족 화합물에서 기인한 신호가 나타났다. 이들은 짝지음 상수 값 2.6 Hz 를 가지는 doublet 의 proton 신호로써 일반적인 aromatic proton 신호보다 chemical shift 가 고자장으로 이동한 것으로 보아 hydroquinone-type 의 부분 구조가 존재한다는 것을 추정할 수 있었다. 방향족 탄소를 제외한 나머지 6 개의 탄소 신호는 3 개의 이중결합의 존재를 보여주며, 이들 중 δ 134.6, 153.0/ δ 122.0, 162.8 의 탄소 신호와 δ 6.52/ δ 6.17 의 수소 신호는 이미 앞에서 언급한 carbonyl 기의 탄소 신호를 고려할 때 전형적인 α , β -unsaturated ketone 의 존재를 나타내었다. 이들을 제외한 나머지 구조는 분자식을 이용한 불포화도 계산을 통해 하나의 고리를 포함하고 있는 것으로 추정되었다.

Compound 1 의 전체적인 구조는 ^1H COSY, TOCSY, NOESY, gHMQC, gHMBC 와 같은 2D NMR 실험을 이용하여 결정하였다. 정확한 hydroquinone 의 부분구조는 aromatic proton 인 δ 6.31 과 δ 6.39 신호와 연관된 gHMBC 실험 데이터를 분석하여 확인되었다. 즉 gHMBC 실험에서 δ 6.31 과 δ 6.39 의 aromatic protons 는 고자장에서 나타난 δ 2.07 (3H, s)의 methyl proton, 그리고 δ 2.68 (2H, t, $J=6.7$ Hz)의 methylene proton 과의 long-range correlation 을 통해서 3-alkyl-5-methylhydroquinone 부분구조가 존재함이 증명되었다. ^1H COSY 실험에서도 δ 2.68 의 benzylic methylene protons 가 δ 1.74 (2H, m)의 methylene protons 와 직접적인 coupling 을 하는 것을 관찰함으로써 두 methylene proton 들이 바로 인접해 있음을 알 수 있었다. 그리고 gHMBC 스펙트럼 상에서 δ 1.75 의 methylene protons 을 가지고 있는 탄소(δ 32.8) 신호와 주변 protons 와의 사이에서 long-range coupling 이 관찰되고, 또 δ 1.24(3H, s)의 methyl protons 가 δ 76.1, δ 32.8, δ 40.8 의 탄소 신호와 long-range coupling 을 보이는 것으로 보아 chromanol moiety 가 존재함을 알 수 있었다. 유사하게 δ 1.59(H-15'), 1.78(H-16'), 1.96(H-14'), 2.15(H-13')의 vinyl methyl proton 들이 이웃하는 탄소들 사이에서 관찰되는 long-range correlation, 또 ^1H COSY 실험에서 olefinic proton 이 고자장 수소들 사이에서 나타내는 correlation 을 분석함으로써 linear prenyl 부분구조가 존재하는 것을 추정할 수 있었다. 그리고 δ 1.78(H-14')의 수소 신호가 δ 200.43 의 ketone 과 long-range correlation 을 보임으로서, $=\text{CH}(8')-\text{C}(9')-\text{CH}(\text{C}10')=$ 으로 연결됨을 확인하였다.

또한 compound 1 에 존재하는 C-3', C-7', C-10' 위치의 double bonds 의 배열은 고자장으로 이동한 δ 15.7 (C-15'), δ 10.4 (C-14'), δ 21.7(C-12'), δ 28.3(C-13') 의 vinyl methyl 의 탄소 신호와 NOESY 스펙트럼을 종합하여 *E* 형태로 결정하였다. 이와 같이 compound 1 의 구조는 12-(3,4-dihydro-6-hydroxy-2,8-dimethyl-2H-1-benzopyran-2-yl)-2,5,9-trimethyl-dodeca-(5*E*,9*E*)-2,5,9-trien-4-one 으로 결정되었으며 지금까지 보고되지 않은 신규 화합물이다.

Compound 2 무색의 gum 형태로 분리 되었으며, 분자식은 질량 분석 [HREIMS([M]⁺ *m/z* 428.2915)]과 ¹³C NMR 에 의해서 C₂₇H₄₀O₄ 로 확인되었다. NMR 스펙트럼 분석 결과 compound 1 과 매우 유사한 tetraprenyl chromanol 화합물임을 알 수 있었다. IR spectrum 에서 나타난 1621 cm⁻¹ 부근의 강한 흡수띠와 ¹³C NMR 스펙트럼의 δ 203.3 (C-10') 의 신호를 통해 carbonyl 의 존재를 확인할 수 있었으며, 이는 δ 118.7 과 δ 159.6 의 탄소 신호와 δ 6.12 의 수소 신호와 함께 전형적인 α , β -unsaturated ketone 의 존재를 나타내었다.

NMR 스펙트럼 분석 결과, compound 2 는 동종의 시료에서 분리된 Sargachromanol K 와 매우 유사한 데이터를 보여주었으며 (Kang et al 2005; Lee and Seo 2011), 이를 table 7 에 나타내었다. 두 화합물은 tetraprenyl chromanol 화합물로서 oxymethine(C-9', δ 80.5; H-9', δ 4.04)과 α , β -unsaturated ketone 이 연결되어 있는 동일한 형태의 말단 isoprene 단위를 보여주었다. 두 화합물의 뚜렷한 차이점은 두번째 isoprene

단위의 olefinic carbon 신호가 사라지고 sp^3 결합을 가지는 methine(C-8, δ 37.3; H-8', δ 1.90)과 methylene(C-7', δ 153.0, H-7', δ 1.96) 신호가 나타남으로서 7' 위치의 이중결합이 환원되었음을 알 수 있었다. 이와 같이 compound 2 의 구조는 13-(3,4-dihydro-6-hydroxy-2,8-dimethyl-2H-1-benzopyran-2-yl)-5-hydroxy-2,6,10-trimethyl-trideca-(10*E*)-2,10-dien-4-one 으로 결정되었으며 이 물질 또한 *S. siliquastrum* 에서 처음으로 분리된 신규 화합물임이 확인되었다.

Compound 3 역시 무색의 gum 형태로 분리 되었으며, 분자식은 HREIMS($[M]^+$ m/z 430.3080) 와 ^{13}C NMR 에 의해서 $C_{27}H_{42}O_4$ 임을 알 수 있었다. NMR 스펙트럼 분석 결과, 앞서 분리된 chromanol 계열의 화합물임이 확인되었다. ^{13}C NMR 스펙트럼의 δ 218.5 (C-10') 과 IR spectrum 에서 보여지는 1711 cm^{-1} 부근의 강한 흡수띠는 carbonyl 기가 존재함을 보여 주어 compound 2 와 매우 유사한 형태의 화합물임을 암시하였다. Compound 3 의 가장 큰 특징은 isoprene 단위에서 확인되는 olefinic carbon 신호가 δ 125.8(3')과 135.6(4')의 두 곳에서만 관찰되었다는 것이다. 이는 compound 2 와 동일하게 Sargachromanol K 에 존재하였던 두번째 isoprene 단위의 이중결합이 사라지고 단일결합 신호인 δ 26.7(C-6'), 42.3(C-7'), 34.5(C-8')로 바뀌었음을 나타낸다. 또한 3 번째 말단 isoprene 단위의 olefinic carbon (C-11' -12') 신호도 사라지고 δ 43.4 와 δ 28.4 에 각각 methine (C-12') 및 methylene(C-11')의 신호가 나타났다. 이러한 변화는 이 물질이 Sargachromanol K 의 prenyl part 에 존재했던 2 개의 이중결합들이 환원된 7',

8', 11', 12'-tetrahydro 유도체임을 보여주었다. 이와 같이 compound **3** 의 구조는 13-(3,4-dihydro-6-hydroxy-2,8-dimethyl-2H-1-benzopyran-2-yl)-5-hydroxy-2,6,10-trimethyl-trideca-10*E*-en-4-one 으로 결정되었으며 처음으로 분리된 신규 화합물이다.

Compound **4**, **5** 그리고 **6** 은 이전 연구에서 분리되어 Lee 와 Seo(2011)의 논문으로 발표하였으며, 이들은 각각 sargachromanol D(**4**), E(**5**), K(**6**)이다.



Table 6. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound **1**

No.	^1H	^{13}C
2		76.14 s
3	1.75 (2H, m)	32.83 t
4	2.68 (2H, t, $J=6.7$ Hz)	23.48 t
4a		122.20 s
5	6.31 (1H, d, $J=2.6$ Hz)	113.52 d
6		150.23 s
7	6.39 (1H, d, $J=2.6$ Hz)	116.51 d
8		127.63 s
8a		146.16 s
1'	1.56 (2H, m)	40.38 t
2'	2.13 (2H, m)	23.30 t
3'	5.15 (1H, t, $J=7.3$ Hz)	127.07 d
4'		134.43 s
5'	2.10 (2H, m)	38.84 t
6'	2.43 (2H, q, $J=7.2$ Hz)	28.63 t
7'	6.52 (1H, tq, $J=7.2, 1.4$ Hz)	152.97 d
8'		134.61 s
9'		200.43 s
10'	6.17 (1H, m)	121.98 d
11'		162.82 s
12'	1.96 (3H, d, $J=1.5$ Hz)	28.30 q
13'	2.15 (3H, d, $J=1.0$ Hz)	21.73 q
14'	1.78 (3H, d, $J=1.0$ Hz)	10.48 q
15'	1.59 (3H, s)	15.74 q
16'	1.24 (3H, s)	24.53 q
17'	2.07 (3H, s)	16.42 q
18'	2.12 (3H, s)	16.16 s

Measured in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

Table 7. ¹H NMR spectral data for compounds **2**, **3**, and sagachromanol K(**6**)

No.	2 ^a	3 ^a	sargachromanol K ^b
2			
3	1.74(2H, m)	1.74(2H, m)	1.79 (1H, dt, J=13.7, 6.8 Hz) 1.73 (1H, dt, J=13.7, 6.8 Hz)
4	2.67(2H, t, J=6.7 Hz)	2.67(2H, t, J=6.9 Hz)	2.69 (2H, t, J=6.8 Hz)
4a			
5	6.30(1H, d, J=2.2 Hz)	6.31(1H, d, J=2.0 Hz)	6.36 (1H, d, J=3.0 Hz)
6			
7	6.39(1H, d, J=2.2 Hz)	6.38(1H, d, J=2.0 Hz)	6.46 (1H, d, J=3.0 Hz)
8			
8a			
1'	1.98(2H, m)	1.98(2H, m)	1.64 (1H, dt, J=15.1, 7.1 Hz) 1.54 (1H, dt, J=15.1, 8.3 Hz)
2'	2.12(2H, m)	2.14(2H, m)	2.13 (2H, m)
3'	5.15(2H, td, J=7.15, 1.1 Hz)	5.13(2H, q, J=6.4 Hz)	5.15 (1H, t, J=6.5 Hz)
4'			
5'	1.59(2H, m)	1.61(2H, m)	2.05 (2H, t, J=7.3 Hz)
6'	1.31(1H, m), 1.45(1H, m)	1.31(2H, m), 1.46(1H, m)	2.18 (2H, m)
7'	1.89(2H, m)	1.59(2H, m)	5.59 (1H, t, J=6.9 Hz)
8'	1.45(1H, m)	1.61(1H, m)	
9'	4.04(1H, d, J=3.0 Hz)	4.18(1H, dd, J=10.2, 3.6 Hz)	4.41 (1H, d, J=4.1 Hz)
10'			
11'	6.25(1H, br, J=1.2 Hz)	1.36(2H, m)	6.12 (1H, br s)
12'		1.51(1H, m)	
13'	1.94(3H, d, J=1.2 Hz)	0.94(3H, d, J=3.58 Hz)	1.91 (3H, s)
14'	2.16(3H, d, J=1.1 Hz)	0.97(3H, d, J=3.57 Hz)	2.21 (3H, s)
15'	0.70(3H, d, J=6.8 Hz)	1.04(3H, d, J=6.88 Hz)	1.41 (3H, s)
16'	1.58(3H, s)	1.57(3H, s)	1.61 (3H, s)
17'	1.23(3H, s)	1.24(3H, s)	1.26 (3H, s)
18'	2.07(3H, s)	2.07(3H, s)	2.12 (3H, s)

Measured in (a) CD₃OD and (b)CDCl₃ at 300 MHz, respectively.

Assignments were aided by ¹H gDQCOSY, TOCSY, DEPT., gHMOC, and gHMBC experiments.

Table 8. ^{13}C NMR spectral data for compounds **2**, **3**, and sagachromanol K(**6**)

No.	2 ^a	3 ^a	K ^b
2	76.2 s	76.2 s	75.2 s
3	32.8 t	33.3 t	31.5 t
4	23.5 t	23.3 t	22.6 t
4a	122.2 s	122.2 s	121.1 s
5	113.5 d	113.5 d	112.5 d
6	152.2 s	150.2 s	147.6 s
7	116.5 d	116.5 d	115.6 d
8	127.6 s	127.6 s	127.2 s
8a	150.2 s	146.2 s	145.8 s
1'	40.0 t	40.6 t	39.7 t
2'	23.3 t	23.5 t	22.3 t
3'	125.6 d	125.8 d	124.7 d
4'	135.9 s	135.6 s	134.5 s
5'	40.6 t	40.6 t	39.0 t
6'	26.6 t	26.7 t	26.7 t
7'	37.3 t	42.3 t	132.5 d
8'	34.5 d	32.8 d	132.6 s
9'	80.5 d	75.4 d	83.4 d
10'	203.3 s	218.5 s	199.01 s
11'	120.9 d	28.4 d	118.7 d
12'	159.3 s	43.4 s	159.6 s
13'	28.0 q	21.7 q	28.1 q
14'	21.3 q	24.0 q	21.4 q
15'	13.7 q	17.8 q	10.9 q
16'	15.8 q	15.8 q	15.9 q
17'	24.5 q	24.5 q	24.0 q
18'	16.4 s	16.4 s	16.2 s

Measured in (a) CD_3OD and (b) CDCl_3 at 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

Compound **1** : colorless gum; $[\alpha]_D^{20}$: +12.67 ° (*c* 0.12, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} =3400 - 3300, 2932, 1682, 1620, 1470, cm^{-1} ; UV (MeOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$ 237 (3.77) nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 6 ; HRFABMS m/z 410.2821 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_3$, 410.2821)

Compound **2** : colorless gum; $[\alpha]_D^{25}$: +42.86 ° (*c* 0.73, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} =3400 - 3300, 2855, 1621, cm^{-1} ; UV (MeOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$ 224 (3.86) nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 7 and 8; HREIMS m/z 428.2915 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_4$, 428.2927)

Compound **3** : colorless gum; $[\alpha]_D^{25}$: +27.27 ° (*c* 0.13, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} =3400 - 3300, 2933, 1711, 1472, 1378, cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 7 and 8, respectively; HREIMS m/z 430.3080 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_4$, 430.3083)

Compound **4** : colorless gum; $[\alpha]_D^{25}$: +9.52 ° (*c* 0.21, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} =3400 - 3300, 2975, 2930, 1645, 1470, 1375, 1220 cm^{-1} ; LRFABMS m/z 451 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.51 (1H, d, 2.5 Hz, H-7), 6.41 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-5), 5.50 (1H, t, $J=6.9$ Hz, H-7'), 5.17 (1H, t, $J=6.5$ Hz, H-3'), 5.17 (1H, t, $J=8.9$ Hz, H-11'), 4.33 (1H, dd, $J=8.9$, 6.6 Hz, H-10'), 3.91 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H-9'), 2.73 (2H, t, $J=6.7$ Hz, H-4), 2.17 (2H, m, H-6'), 2.12 (3H, s, H-18'), 2.09 (2H, m, H-2'), 2.01 (2H, t, $J=7.4$ Hz, H-5'), 1.79 (1H, m, Ha-3), (1H, m, H_b-1.71), 1.77 (3H, s, H-13'), 1.73 (3H, s, H-14'), 1.65 (3H, s, H-15'), 1.60 (2H, m, H-1'), 1.58 (3H, s, H-16'), 1.30 (3H, s, H-17'); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 147.7(C-6), 145.8(C-8a),

139.1(C-12'), 134.5(C-4'), 133.5(C-8'), 129.5(C-7'), 127.2(C-8), 124.7(C-3'), 123.3(C-11'), 121.1(C-4a), 115.6(C-7), 112.5(C-5), 80.2(C-9'), 75.3(C-2), 69.2(C-10'), 39.6(C-1'), 39.18(C-5'), 31.4(C-3), 26.1(C-6'), 26.1(C-13'), 24.1(C-17'), 22.5(C-4), 22.2(C-2'), 18.7(C-14'), 16.4(C-18'), 15.8(C-16'), 11.9(C-15').

Compound **5** : colorless gum; $[\alpha]_D^{25}$: +8.57° (c 0.23, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} =3400 - 3300, 2975, 2930, 1470, 1375, 1220 cm^{-1} ; LRFABMS m/z 451 $[M+Na]^+$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.40 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H-5), 6.32 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H-7), 5.36 (1H, t, $J=6.3$ Hz, H-7'), 5.15 (1H, t, $J=6.7$ Hz, H-3'), 5.04 (1H, br d, $J=9.3$ Hz, H-11'), 4.25 (1H, d, $J=9.3, 8.1$ Hz, H-10'), 3.72 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-9'), 2.68 (2H, t, $J=6.6$ Hz, H-4a), 2.08 (2H, m, H-6'), 2.13 (2H, m, H-2'), 2.07 (3H, s, H-18'), 1.98 (2H, t, $J=6.6$ Hz, H-5'), 1.74 (2H, m, H-3), 1.69 (3H, d, $J=1.0$ Hz, H-14'), 1.67 (3H, d, $J=1.0$ Hz, H-13'), 1.61 (1H, m, H_a-1'), 1.58 (3H, s, H-16'), 1.56 (3H, s, H-15'), 1.52 (1H, m, H_b-1'), 1.27 (3H, s, H-17'); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 150.2(C-6), 146.2(C-8a), 136.7(C-12'), 135.6(C-4'), 135.5(C-8'), 129.3(C-7'), 127.6(C-8), 125.7(C-3'), 125.6(C-11'), 122.1(C-4a), 116.5(C-7), 113.5(C-5), 82.6(C-9'), 76.1(C-2), 71.3(C-10'), 40.6(C-1'), 40.3(C-5'), 32.8(C-3), 27.2(C-6'), 26.2(C-13'), 24.5(C-17'), 23.5(C-4), 23.3(C-2'), 18.6(C-14'), 16.4(C-18'), 16.0(C-16'), 12.4(C-15')

Compound **6** : colorless gum; $[\alpha]_D^{20}$: +16.67° (c 0.12, MeOH); IR (NaCl) :

ν_{\max} =3400 - 3300, 2930, 1680, 1620, 1470, 1220 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$)
237 (3.77) nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 7 and 8; LREIMS m/z 426 $[\text{M}]^{+1}$



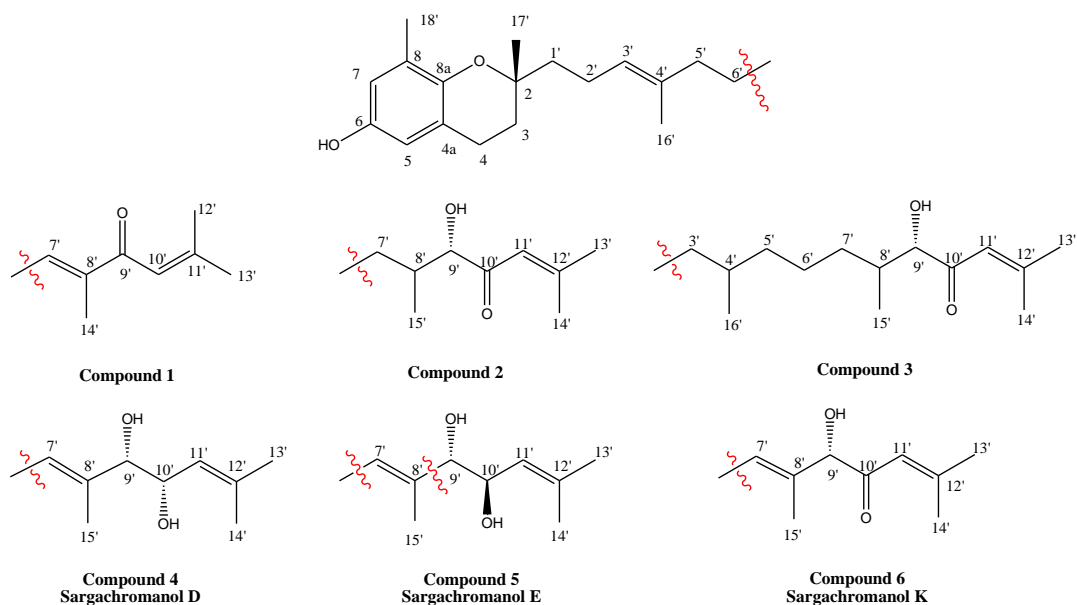
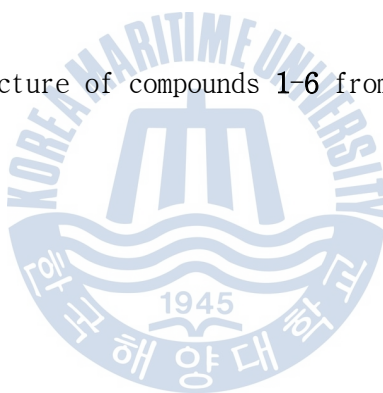


Figure 9. Chemical structure of compounds 1-6 from *S. siliquastrum*



3.1.2. 쇠비름으로부터 활성 성분의 구조 결정(7-13)

쇠비름의 85% aq.MeOH 층으로부터 6 개의 새로운 형태의 homoisoflavonoids (7-12)를 분리하였으며, homoisoflavonoids 의 전구체인 chalcone(13) 형태의 화합물을 분리하였다.

Compound 7 은 무색의 needle 형태로 분리되었으며, ^{13}C NMR 스펙트럼과 HRFAB-MS($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 301.1076) 질량 분석을 통하여 분자식 $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$ 을 결정하였다. IR spectrum 분석 결과, OH group 과 α, β -unsaturated C=O group 의 흡수스펙트럼이 각각 3382 과 1657 cm^{-1} 에서 나타났으며, $1600 \sim 1500\text{ cm}^{-1}$ 사이의 흡수 신호를 통해 aromatic ring 의 흡수스펙트럼을 확인하였다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서 한 개의 δ 198.9 의 ketone 신호와 aromatic carbon 들로 예상되는 δ 170 – 90 부근의 12 개의 신호 그리고 aliphatic 신호인 δ 67.0(C-2), 46.0(C-3), 26.7(C-9)의 신호를 관찰할 수 있었다. 그리고 ^1H NMR 스펙트럼에서는 방향족 화합물에서 기인한 6 개의 수소 신호와 두개의 methylene, 한 개의 methine 신호를 관찰할 수 있었다. δ 4.45(1H, dd, $J=11.3, 4.8\text{ Hz}$, H-2a)와 δ 4.17(1H, dd, $J=11.3, 9.8\text{ Hz}$, H-2b)의 methylene 신호, δ 3.14 (1H, m, H-3)의 methine 신호 그리고 δ 3.08(1H, dd, $J=15.9, 3.2\text{ Hz}$, H-9a)와 2.86(1H, dd, $J=15.9, 7.9\text{ Hz}$, H-9b)의 methylene 신호는 전형적인 3-benzyl-4-chromanone 구조(Adinolfi et al 1989)를 나타내고 있으며 ^{13}C NMR 스펙트럼 분석 결과도 이러한 분석을 지지하였다. 그리고 homoisoflavonoids 를 나타내는 수소 신호 뿐만 아니라, aromatic ring 에 결합된 1 개의 methoxy group [δ 3.79(3H, s)] 및 carbonyl

group 에 분자내 수소결합으로 연결된 hydroxyl group[δ 11.8(1H, s, C(5)-OH)]의 수소 신호도 확인되었다.

Compound 7 의 세부적인 구조는 1D 와 2D NMR 실험을 이용하여 결정하였다. ^1H NMR 스펙트럼에서 나타나는 δ 6.03(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-6)과 δ 5.95(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-8)의 aromatic proton 신호는 일반적인 aromatic proton 신호보다 chemical shift 값이 고자장으로 이동한 것으로 보아 hydroquinone type 이며, 두 수소 신호 사이의 짝지음 상수값 2.2 Hz 를 통해 서로 *meta* 위치에 존재하는 것을 알 수 있었다. gHMBC 실험에서 δ 3.79(3H, s, C(7)-OCH₃)의 methoxyl 신호가 δ 168.2 (C-7)와 correlation 을 나타내었으며, carbonyl group 의 산소와 분자내 수소결합되어 되어 나타난 δ 11.8[1H, s, C(5)-OH]의 -OH 신호는 δ 164.2(C-5), 102.7(C-4a), 95.0(C-6)과의 연결을 보여줌으로써 탄소 5 번과 7 번에 hydroxyl group 과 methoxy group 이 치환된 A-ring system 을 확인하였다. 그리고 B-ring system 은 나머지 4 개의 aromatic proton 신호를 통해 이들의 결합양식이 확인되었다. 먼저 δ 7.13(1H, dt, $J=8.3, 1.7$ Hz, H-4')의 수소신호는 δ 6.86(1H, dd, $J=8.3, 1.1$ Hz, H-3')의 수소신호에 의해 짝지음 상수 $J=8.3$ Hz 를 보임으로써 서로 *ortho*-위치에 존재함을 알 수 있으며, 또한 δ 6.81(1H, dd, $J=8.3, 1.7$, H-6')의 수소신호에 의해 짝지음 상수 $J=1.7$ Hz 를 보임으로써 서로 *meta*-위치에 존재하는 것으로 확인되었다. 그리고 δ 6.86(H-3')의 수소신호는 짝지음상수($J=1.1$ Hz)에 의해 δ 7.05(1H, dt, $J=8.3, 1.1$ Hz, H-5')와 서로 *meta*-위치에 존재하며, 다시 δ 7.05(H-5')는 유사하게 짝지음상수에 의해 δ

6.81(H-6')과 서로 *ortho*-위치에 존재함이 확인되었다. 따라서, 4 개의 aromatic 수소 신호는 일렬로 연결된 구조로 되어 있으며, -OH group 이 치환된 δ 154.2(C-2') 탄소와 H-3', 4', 9 사이의 long-ranged correlation 을 확인하므로써 C-2' 자리에 hydroxy group 이 연결된 B-ring system 임을 확인하였다. B-ring system 에서 C-2'탄소에 -OR group 이 치환된 형태는 C-4' 탄소에 methoxy 가 함께 결합한 형태로 Chang 등(2002)에 의해서 처음 분리되었지만 B-ring system 에서 C-2'에 단독으로 hydroxy group 이 치환된 형태는 쇠비름에서 처음 발견되었다. 이와 같이 compound 7 의 구조는 5-hydroxy-7-methoxy-3-(2'-hydroxybenzyl)-4-chromanone 로 결정되었으며 이전에 보고되지 않은 신규화합물임이 확인되었다.

Compound 8 은 무색의 needle 형태로 분리되었고, 이 물질의 분자식은 ^{13}C NMR 데이터와 HRFAB-MS 질량 분석을 통하여 분자식 $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_5$ 로 결정되었다. IR 스펙트럼 분석결과, compound 7 과 유사한 흡수 스펙트럼을 나타내었으며, ^1H 와 ^{13}C NMR 데이터 결과에서도 compound 7 과 유사한 스펙트럼 양상을 확인할 수 있었다. ^1H NMR 스펙트럼에서 나타난 $-(2)\text{CH}_2-(3)\text{CH}-(9)\text{CH}_2-$ 의 부분구조의 존재를 δ 4.48 (1H, dd, $J=11.0, 5.0$ Hz, H-2a)와 4.15(1H, t, $J=11.3$ Hz, H-2b)의 methylene 신호, δ 3.03 (1H, m, H-3)의 methine 신호 그리고 δ 3.05(1H, dd, $J=13.9, 3.8$ Hz, H-9a)와 2.86(1H, dd, $J=13.9, 7.2$ Hz, H-9b)의 methylene 신호로부터 확인할 수 있어, compound 8 또한 전형적인 3-benzyl-4-chromanone 구조임이 확인되었다. B-ring system 을 이루는 4 개의 aromatic ring 의 수소 신호[δ 7.10(1H, td, $J=8.0, 1.7$ Hz, H-4'), δ 7.02(1H, dd,

J=7.5, 1.7 Hz, H-6'), 6.81(1H, dt, J=8.0, 1.1 Hz, H-6'), 6.81(1H, dt, J=7.5, 1.0 Hz, H-3'))는 compound 7 에서 보여주는 수소 신호와 같은 양상을 나타냄으로서, 2' 탄소에 hydroxy group 이 연결된 2'-hydroxybenzyl 형태의 aromatic ring 임을 확인하였다. ^1H NMR 스펙트럼 분석 결과, compound 7 의 A-ring system 에서 나타나는 hydroxyl group 의 수소 신호가 사라지고 δ 3.80(1H, s)의 methoxy group 수소 신호가 생성된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 새로이 추가된 methoxy group 의 위치는 5 번 탄소일 것으로 예상되었으며, 이는 gHMBC 실험에서 나타난 methoxy group 과 δ 165.2(C-5), 105.2(C-4a), 93.2(C-6) 사이의 long ranged coupling 에 의해서 확인되었다. 따라서 compound 8 는 compound 7 의 5 번 탄소에 methoxy group 이 치환된 형태의 화합물이며 그 구조는 5,7-dimethoxy-3-(2'-hydroxybenzyl)-4-chromanone 으로 결정되었다.

Compound 9 은 무색의 needle 형태로 분리되었으며 분자식은 ^{13}C NMR 데이터와 HRFAB-MS 질량 분석을 통하여 $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6$ 로 결정하였다. Compound 9 또한 ^1H NMR 스펙트럼에서 $-(2)\text{CH}_2-(3)\text{CH}-(9)\text{CH}_2-$ 의 패턴을 확인하므로써 compound 7 과 유사한 형태의 homoisoflavonoids 라고 사료되었다. ^1H NMR 스펙트럼 분석 결과, B-ring system 을 연결하는 aromatic 수소 신호는 compound 7 과 동일한 패턴임을 확인할 수 있었으며, A-ring system 의 수소 신호에 기인하는 δ 6.00(1H, s, H-8)의 aromatic 수소 신호와 hydroxyl group 의 수소 신호(δ 11.7), 2 개의 methoxy group 을 나타내는 신호[δ 3.80(3H, s, C(6)-OCH₃), 3.86(3H, s, C(7)-OCH₃)]를 확인할 수 있었다. δ

6.00(1H, s, H-8)의 singlet 신호를 통하여 compound 7 의 *meta* 위치에 존재했던 aromatic 수소가 사라졌음을 확인하였으며, ^{13}C NMR 스펙트럼에서도 산소가 치환되지 않은 방향족 탄소 신호가 사라지고 산소가 치환된 형태의 탄소신호가 나타남으로써 6 번과 8 번 탄소에 methoxy group 이 치환되었음을 추측 할 수 있었다. 이는 gHMBC 실험을 통해서 δ 3.80(3H, s, C(6)-OCH₃)의 신호와 6 번 탄소(δ 131.0) 신호 사이에 correlation 이 확인됨으로써 6 번 탄소에 methoxy group 이 치환된 것이 확인되었다. 이와 같은 A-ring system 은 Mutanyatta 등(2003)에 의해 발표된 논문에서도 비슷한 패턴의 신호가 확인되었으며 그 데이터와도 잘 일치하였다. 따라서 compound 9 은 5-hydroxy-6,7-dimethoxy-3-(2'-hydroxybenzyl)-4-chromanone 로 결정되었으며 지금까지 보고되지 않은 신규의 화합물임을 확인하였다.

Compound 10 은 무색의 needle 형태로 분리되었으며 HRFAB-MS 와 ^{13}C NMR 스펙트럼 분석을 통해 C₁₉H₂₀O₆ 의 분자식을 구하였다. compound 10 역시 위에서 분리된 화합물과 유사한 구조로서 compound 9 과 매우 유사한 NMR 스펙트럼을 가지는 것으로 나타났다. ^1H NMR 스펙트럼분석 결과, 3-benzyl-4-chromanone 의 전형적인 형태를 나타내는 aliphatic 수소 신호와 B-ring system 을 나타내는 4 개의 방향족 수소 신호를 관찰 할 수 있었다. 그리고 3 개의 methoxy group 과 1 개의 방향족 수소 신호를 확인하였다. Compound 9 의 ^1H 과 ^{13}C NMR 스펙트럼과 비교 분석 결과, ^{13}C NMR 에서 산소가 치환된 방향족 탄소 신호의 수는 변함이 없었으며, ^1H NMR 스펙트럼에서 hydroxy group 에 기인한 수소 신호가 사라지고 δ 3.90(3H, s)의 methoxy group 의 수소 신호가 생성됨을

확인하였다. 그 결과, 5 번 탄소에 결합된 hydroxy group 이 methoxy group 으로 치환된 것을 예상할 수 있었으며, gHMBC 실험에서도 δ 3.90 수소 신호와 5 번 탄소간의 correlation 이 확인되어 이 사실을 지지하였다. 이와 같은 ring system 은 Silayo 등(1999)에 의해 보고된 바 있으며 문헌치와 잘 일치하였다. 이와 같이 Compound 10 의 구조는 5,6,7-trimethoxy-3-(2'-hydroxybenzyl)-4-chromanone 으로 결정되었으며 새로운 화합물임이 확인되었다.

Compound 11 는 무색의 needle 형태로 분리되었으며 HRFAB-MS 와 ^{13}C NMR 스펙트럼 분석을 통해 분자식 $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6$ 을 결정하였다. ^1H 과 ^{13}C NMR 스펙트럼 분석 결과, compound 7 과 매우 유사한 A 와 B 방향족 고리 형태를 확인하였다. A-ring system 을 이루는 δ 5.95(1H, d, $J=2.3$, H-8)과 6.40(1H, d, $J=2.3$, H-6)의 방향족 수소 신호와 7 번 탄소에 연결된 methoxy group(δ 3.80, 3H, s) 그리고 carbonyl group 과 수소결합으로 연결된 hydroxy group 의 수소 신호(δ 11.84, 1H, s)로부터 compound 7 과 동일한 A-ring system 을 이루는 것을 확인하였다. 그리고 4 개의 방향족 수소가 연속적으로 연결된 2-hydroxybenzyl 형태의 B-ring system [δ 7.20(1H, td, $J=7.4$, 1,7 Hz, H-4'), 7.00(1H, dd, $J=8.0$, 1,7 Hz, H-6'), 6.98(1H, dd, $J=8.0$, 1,4 Hz, H-3'), 6.88(1H, dd, $J=7.4$, 1,4 Hz, H-3')]을 확인하였다. compound 7 과 가장 큰 차이점은 aliphatic moiety 에서 볼수 있었던 $-(2)\text{CH}_2-(3)\text{CH}-(9)\text{CH}_2-$ 패턴이 $-(2)\text{CH}_2-(3)\text{CH}-(9)\text{CH}-$ 로 바뀌었다는 것이었다. 기존의 δ 2.8-3.1 부근에서 보이던 methylene 수소 신호가 사라지고 δ 5.82(t, $J=3.9$ Hz, H-9)의 methine 신호가

생성되므로 C-9 에 hydroxy group 이 치환되었음을 예상하였으며, ^{13}C NMR 스펙트럼에서도 δ ~26 부근에서 볼수 있었던 탄소신호가 사라지고, δ 71.0 에서 hydroxy group 이 치환된 oxymethine 의 신호를 보여 주었다. 이는 Lopez 등(2006)이 마디풀(*Polygonum ferrugineum*)에서 분리한 5,7-dihydroxy-6-methoxy-3-(9-hydroxy-phenylmethyl)-chroman-4-one 과 유사한 형태의 -(2) CH_2 -(3) CH -(9) CH - 패턴이었으며 보고된 문헌값과도 잘 일치하였다. 이와 같이 compound 11 의 구조는 5,9-dihydroxy-7-methoxy-3-(2'-hydroxybenzyl)-4-chromanone 으로 결정되었으며, 새로운 신규 화합물임이 확인되었다.

Compound 12 는 무색의 needle 형태로 분리되었으며 HRFAB-MS 와 ^{13}C NMR 스펙트럼 분석을 통해 분자식 $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$ 을 결정하였다. 이 화합물 또한 ^1H 과 ^{13}C NMR 스펙트럼 분석결과, 지금까지 분리된 화합물과 유사한 형태의 homoisoflavonoid 임이 확인되었다. A-ring system 을 이루는 δ 5.98(1H, d, $J=2.3$ Hz, H-8)과 6.05(1H, d, $J=2.3$ Hz, H-6)의 방향족 수소 신호와 7 번 탄소에 연결된 methoxy group(δ 3.83, 3H, s) 그리고 4 개의 방향족 수소가 연속적으로 연결된 2-hydroxybenzyl 형태의 B-ring system[[δ 7.11, 7.05, 6.83, 6.83] 이 확인되어 compound 12 또한 compound 7 과 동일한 방향족 고리 형태를 가지는 것으로 여겨졌다. Compound 7 과 비교하였을 때 가장 큰 차이점은 ^1H NMR 스펙트럼에서 전형적인 3-benzyl-4-chromanone 의 aliphatic part[-(2) CH_2 -(3) CH -(9) CH_2 -]를 이루던 H-3 과 H-9 의 sp^3 형태의 수소 신호가 사라지고, sp^2 의 수소 신호인 1 개의 olefinic 수소 δ 7.94(1H, brs, H-9)가 나타났으며, ^{13}C NMR 스펙트럼에서도 δ 130.1(C-3), 134.7(C-9)의 olefinic

탄소 신호가 확인되어 3 번 탄소와 9 번 탄소 사이에 이중 결합이 형성되어 있는 3-benzylidene-4-chromanone 의 구조를 가지는 것으로 예측되었다. Silayo 등(1997)에 따르면 3-benzylidene-4-chromanone 의 전형적인 E-geometry 의 proton chemical shift 는 δ 7.6-7.9 의 값을 가지며, Z-geometry 일 경우에는 δ 5.5 (Heller & Thamm, 1981) 정도의 값을 나타내는 것으로 보고되었다. Compound 6 의 H-9 신호는 δ 7.84 에 나타나 E-geometry 의 화합물임이 확인되었다. 따라서 compound 6 의 구조는 (*E*)-5-hydroxy-7-methoxy-3-(2'-hydroxybenzyl)-4-chromanone 로 결정되었으며 이전에 보고되지 않은 새로운 화합물로 밝혀졌다.

Compound 13 은 yellow needles 로 분리되었으며, HRFAB-MS 와 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터를 통하여 분자식 $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$ 을 결정하였다. compound 13 은 Compound 7 에서 관찰되는 두개의 방향족 고리 system 은 관찰되었지만 aliphatic part [-(2) CH_2 -(3) CH -(9) CH_2]-는 관찰되지 않았고, 분자식을 이용한 불포화도 계산에서도 1 개가 부족한 것으로 나타나, chromanone 고리가 절단된 형태의 화합물인 것으로 예상되었다. ^1H NMR 스펙트럼에서 A-ring system 을 이루는 δ 5.94(1H, d, $J=2.3$ Hz, H-5')과 δ 6.01(1H, d, $J=2.3$ Hz, H-3')의 방향족 수소 신호와 4'번 탄소에 연결된 methoxy group (δ 3.83, 3H, s)이 관찰되었다. 그리고 4 개의 방향족 수소가 연속적으로 연결된 2-hydroxybenzyl 형태의 B-ring system [δ 7.53 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-6'), δ 7.22 (1H, t, $J=6.3$ Hz, H-4'), δ 6.93(1H, t, $J=7.5$ Hz, H-5'), δ 6.04(1H, d, $J=8.0$ Hz, H-3')]의 존재를 확인하였다. 새롭게 나타난 δ

7.93(1H, d, $J=15.9$ Hz, H- α)과 8.05(1H, d, $J=15.9$ Hz, H- β)의 수소 신호는 chalcone moiety 에 존재하는 전형적인 trans-olefinic bond 의 존재를 의미하였으며, 이는 Kishore 등(2003)이 보고한 값과 잘 일치하였다. 두개의 olefinic 수소는 gHMBC 데이터 분석을 통해 H- α 의 수소 신호가 C-4 와 correlation 되며, 그리고 H- β 의 수소 신호는 C-2 및 C-6 과 long-ranged correlation을 됨을 관측함으로써 B-ring 의 hydroxy group 이 치환된 탄소 옆에 olefinic carbon 이 존재함을 확인할 수 있었다. 이 화합물의 구조는 homoisoflavonoid 의 전구체인 2,2'-dihydroxy-4',6'-dimethoxychalcone 으로 확인되었으며, 알려진 화합물로서 문헌치와 잘 일치하였다(Kishore et al 2003).



Table 9. ^{13}C NMR spectral data for compounds **7–12** isolated from *P. oleracea*

Position	7	8	9	10	11	12
2	70.2 t	70.0 t	70.0 t	70.4 t	66.6 t	69.0 t
3	47.4 d	45.7 d	45.5 d	47.6 d	51.6 d	130.1 s
4	193.6 s	198.9 s	199.3 s	193.9 s	196.1 s	186.9 s
4a	105.1 s	102.7 s	102.6 s	108.5 s	103.5 s	104.3 s
5	165.2 s	164.2 s	154.1 s	154.3 s	164.1 s	166.0 s
6	93.2 d	95.0 d	131.0 s	137.4 s	95.0 d	95.9 d
7	166.3 s	168.2 s	158.9 s	159.9 s	168.2 s	169.3 s
8	92.9 d	94.1 d	91.3 d	95.9 d	94.1 d	94.7 d
8a	162.4 s	163.0 s	160.9 s	160.0 s	163.1 s	163.9 s
9	26.9 t	26.7 t	27.1 t	26.8 t	71.1 t	134.7 t
1'	124.8 s	124.2 s	124.0 s	124.7 s	123.3 s	122.6 s
2'	154.7 s	154.2 s	154.9 s	154.7 s	155.3 s	157.8 s
3'	117.2 d	116.9 d	116.4 d	117.5 d	117.4 d	116.6 d
4'	128.2 d	128.5 d	128.3 d	128.4 d	126.8 d	132.4 d
5'	120.0 d	120.5 d	120.4 d	120.2 d	120.3 d	120.3 d
6'	130.8 d	131.1 d	130.2 d	130.9 d	129.3 d	131.5 d
-OCH ₃	56.1 q	55.8 q	60.9 q	56.2 q	55.8 q	56.3 q
-OCH ₃	55.6 q		56.2 q	61.7 q		
-OCH ₃				61.3 q		

Measured in CDCl₃ at 75 MHz, respectively

Table 10. ^1H NMR spectral data for compounds **7–9** isolated from *P. oleracea*

No	7	8	9
2	4.48 dd, J=11.0, 5.0 Hz 4.15 t, J=11.3 Hz	4.45 dd, J=11.3, 4.8 Hz 4.17 dd, J=11.3, 9.9 Hz	4.41 dd, J=11.3, 4.4 Hz 4.16 dd, J=11.3, 9.4 Hz
3	3.03 m	3.14 m	3.13 m
4			
4a			
5			
6	6.02 s	6.03 d, J=2.2 Hz	
7			
8	6.02 s	5.95 d, J=2.2 Hz	6.00 s
8a			
9	3.05 m 2.76 m	3.08 m 2.86 m	3.13 m 2.82 dd, J=6.6, 13.0 Hz
1'			
2'			
3'	6.79 td, J=7.4, 1.10 Hz	6.86 dd, J=8.5, 1.1 Hz	6.83 t, J=7.7 Hz -overlap
4'	7.10 td, J=8.0, 1.7 Hz	7.13 td, J=8.5, 1.7 Hz	7.11 t, J=6.9 Hz
5'	6.81 dd, J=8.0, 1.1 Hz	6.81 dd, J=7.4, 1.1 Hz	6.83 t, J=7.7 Hz -overlap
6'	7.02 dd, J=7.4, 1.7 Hz	7.05 dd, J=7.4, 1.7 Hz	7.05 dd, J=7.7, 1.7 Hz
-OCH ₃	3.85 s	3.79 s	3.8 s
-OCH ₃	3.80 s	11.79 s	3.86 s

Measured in CDCl₃ at 300 MHz, respectively

Table 11. ^1H NMR spectral data for compounds **10-12** isolated from *P. oleracea*

No	10	11	12
2	4.50 dd, J=11.3, 3.7, 5.0 Hz 4.16 t, J=11.3 Hz	4.61 t, J=11.3 Hz dd, J=11.3, 5.0 Hz	5.18 d, J=1.9 Hz
3	3.05 m	3.19 ddd, J=8.9, 5.0, 3.9 Hz	
4			
4a			
5			
6		6.4 d, J=2.3 Hz	6.05 d, J=2.3 Hz
7			
8	6.22 s	5.95 d, J=2.3 Hz	5.98 d, J=2.3 Hz
8a			
9	3.04 m 2.82 dd J=6.6, 11.4 Hz	5.82 t, J=4.0 Hz	7.94 brs
1'			
2'			
3'	6.89 d, J=7.70 Hz	6.90 dd, overlap	6.89 m
4'	7.11 td, J=7.4, 7.7, 1.4 Hz	7.00 dd, J=8.0, 1.7	7.26 t, J=8.3 Hz
5'	6.81 t, J=7.4 Hz	6.88 dd, J=8.0, 1.4- overlap	6.87 m
6'	7.02 dd, J=7.7, 1.4 Hz	7.20 td, J=7.4, 1.7 Hz	7.06 d, J=7.8 Hz
(5)- OCH ₃	3.87 s	3.80 s	
(7)- OCH ₃	3.90 s	11.84 s	3.81 s
(6)- OCH ₃	3.78 s		

Measured in CDCl₃ at 300 MHz, respectively

Compound **7** : yellow gum; $[\alpha]_D^{20}$: 11.3° (c 0.53, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} = 3400–3300, 2940, 2931, 1611, 1574, 1022 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} 204, 214, 282 nm; HRFAB-MS($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 301.1074, $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$)

Compound **8** : yellow gum; $[\alpha]_D^{20}$: -4.9° (c 0.82, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} = 3400–3300, 2832, 1611, 1573, 1021 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} 204, 214, 283 nm; HRFAB-MS($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 315.1234, $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_5$)

Compound **9** : yellow gum; $[\alpha]_D^{20}$: $+13.0^\circ$ (c 0.38, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} = 3400–3300, 2942, 2830, 1573, 1453, 1022 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} 205, 217, 282 nm; HRFAB-MS($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 331.1179, $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6$)

Compound **10** : yellow gum; $[\alpha]_D^{20}$: $+5.8^\circ$ (c 0.52, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} = 3400–3300, 2942, 2831, 1603, 1454, 1021 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} 201, 214, 280 nm; HRFAB-MS($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 345.1334, $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6$)

Compound **11** : yellow gum; $[\alpha]_D^{20}$: $+16.7^\circ$ (c 0.30, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} = 3400–3300, 2941, 2861, 1613, 1453, 1022 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} 203, 216, 282 nm; HRFAB-MS($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 317.1023, $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$)

Compound **12** : yellow gum; IR (NaCl) : ν_{\max} = 3400–3300, 2945, 2861, 1582, 1453, 1021 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} 204, 215, 281 nm; LREIMS m/z 300.0998 $[\text{M}]^{+1}$

2,2'-dihydroxy-4',6'-dimethoxychalcone(**13**) yellow gum; IR (NaCl) : ν_{\max} = 3400–3300, 2945, 1861, 1582, 1453, 1021 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} 202, 213, 283 nm; LREIMS m/z 300.31 $[\text{M}]^{+1}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.05 (1H, d,

$J=15.9$ Hz, H-9), 7.93 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-3), 7.53 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-6'), 7.22 (1H, t, $J=6.3$ Hz, H-4'), 6.93 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-5'), 6.04 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-3'), 6.01 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-6), 5.94 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-8), 3.89 (3H, s, (4')-OCH₃), 3.83 (3H, s, -(6')OCH₃): ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 192.8(4), 168.1(7), 166.0(5), 162.4(8a), 155.2(2'), 137.5(9), 131.1(4'), 128.9(6'), 128.2(3), 122.7(1'), 120.8(5'), 116.4(3'), 103.3(4a), 93.7(6), 91.3(8), 55.9(2), 55.6(OCH₃)



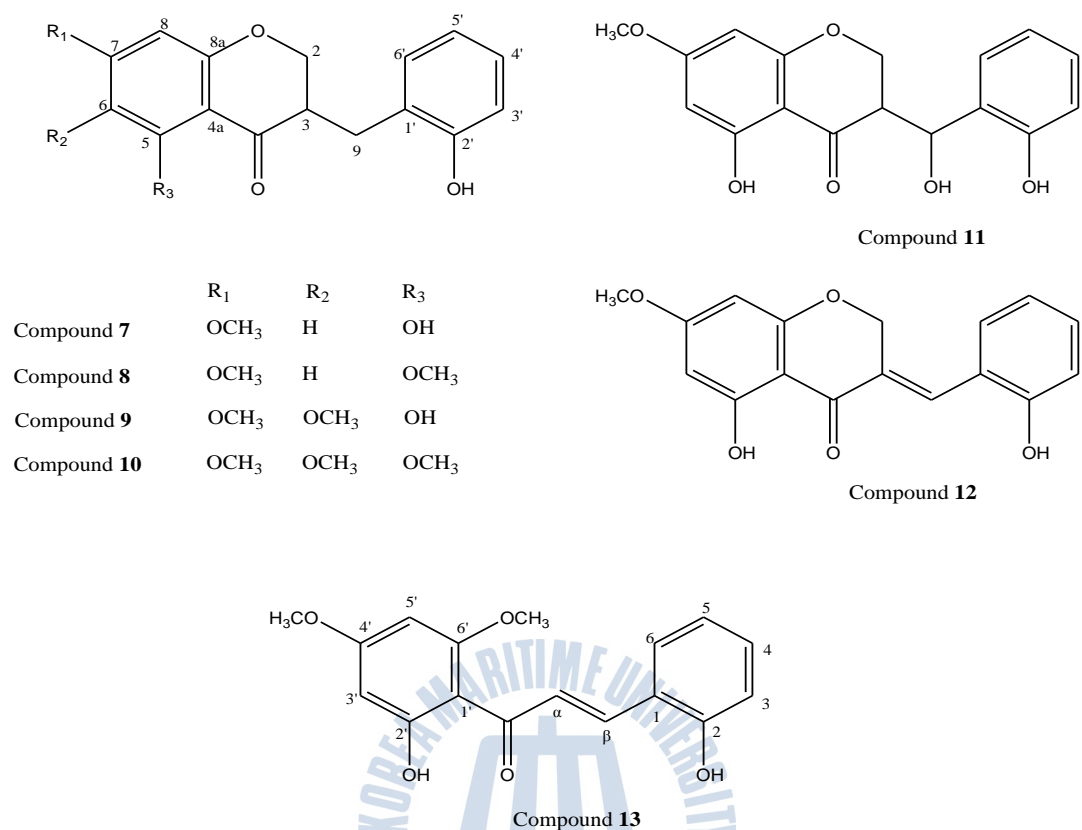


Figure 10. Chemical structure of compounds 7-13 from *P. oleracea*

3.1.3. Homoisoflavonoids 합성

본 연구에서는 Siddaiah 등(2006)의 방법을 응용하여 figure 11 과 같은 방법으로 homoisoflavonoids 를 합성하였다. 초기 반응물로 phloroglucinol (3,5-dihydroxyphenol)을 사용하였으며, phloroglucinol 1 mole 당 2 mole 의 iodomethane 을 첨가하여 3,5-dimethoxyphenol 을 합성하였다. NaH 를 염기로 사용하였으며, 실온에서 24 시간 반응하였다. 합성되어 진 3,5-dimethoxyphenol 은 ^1H NMR 실험을 통해 δ 3.71(6H,s)의 두개의 methoxy group 과 aromatic ring 을 구성하는 서로 meta 형태의 δ 5.84(1H, t, $J=2.2$ Hz)와 5.80(2H, d, $J=2.2$ Hz) 수소 신호를 확인하였다. 3,5-Dimethoxyphenol 은 3-bromopropionic acid 와 반응시켜 3-(3,5-dimethoxyphenoxy)propanoic acid 를 합성하였으며(Siddaiah et al 2006), 용매와 염기로서 각각 DMF 와 NaH 를 사용하여 실온에서 16 시간 반응하였다. 그 결과, aromatic ring 의 수소 신호 δ 6.07(3H, s)와 두 methoxyl 수소 신호 3.75(6H,s)를 관찰할 수 있었으며, propionic acid 에서 기인한 두개의 methylene 신호가 각각 δ 4.20(2H, t, $J=6.2$ Hz) 과 δ 2.83(2H, t, $J=6.2$ Hz)에서 확인되었다. 3-(3,5-Dimethoxyphenoxy)propanoic acid 는 polyphosphoric acid 를 이용한 고리화 반응을 통해서 5,7-dimethoxychroman-4-one 을 합성하였으며, 70~80°C에서 2 시간, 실온에서 2 시간 반응시켰다. ^{13}C NMR 스펙트럼 분석 결과, carboxyl group 의 탄소 신호인 δ 176.3 이 고리화 반응을 통해 downfield 인 δ 189.0 으로 chemical shift 가 이동한 것으로 보아 ketone 의 carbonyl 신호로 전환되었음을 확인할 수 있었으며, ^1H NMR

스펙트럼에서도 두 methylene group 이 각각 4.43(2H, t, J=6.4 Hz) 과 δ 2.69(2H, t, J=6.4 Hz)로 이동되었음을 확인하였다. 이렇게 합성되어 진 chroman-4-one 화합물은 2-methoxybenzaldehyde 와의 반응을 통해 3-benzylidene-4-chromanone 형태의 화합물이 합성되었다. 반응은 용매가 없는 반응으로 염기인 piperidine 을 소량(7 drops)을 첨가하여 2~4 시간동안 120℃에서 반응시켰다. Chromanone ring 의 A-ring system 에서 볼수 있는 *meta*-coupling 이 두 aromatic 수소 신호인 δ 6.09(1H, d, J=2.2 Hz)와 6.03(1H, d, J=2.2 Hz) 사이에서 관찰되었으며, δ 7.33 - 6.98 부근에 나타난 aromatic 수소 신호는 δ 3.90 의 methoxy group 의 수소 신호와 함께 2-methoxybenzyl 형태의 B-ring system 임을 보여주었다. 그리고 δ 7.90(1H, brs)의 olefinic 수소 신호와 δ 5.08 (2H, d, J=1.7 Hz)의 methylene 신호는 전형적인 3-benzylidene-4-chromanone 의 수소 신호임을 나타내었다. 따라서 이 물질의 구조는 5,7-dimethoxy-3-(2-methoxybenzylidene)chroman-4-one 으로 확인되었으며, 이중결합의 배열은 olefinic 수소의 chemical shift 값(δ 7.90)을 통해 (*E*)형의 배열을 가짐을 확인하였다(Heller & Thamm, 1981).

5,7-methoxyl-3-(2-methoxybenzylidene)chroman-4-one 의 환원은 [PbCl₂(dppf)]과 9-BBN/THF 를 사용한 Hoshino 등(1998)의 방법을 이용하여 5,7-dimethoxy-3-(2-methoxybenzyl)chroman-4-one 을 획득하였다. 5,7-methoxyl-3-(2-methoxybenzylidene)chroman-4-one 에서 3 번과 9 번 탄소사이의 이중결합을 나타내는 δ 7.90(1H, brs)의 olefinic 수소 신호와 δ 5.08 (2H, d, J=1.7 Hz)의 methylene 수소 신호가 사라지고 δ 4.26 (1H, dd, J=11.3,

4.7 Hz, H_b-2)와 δ 4.09 (1H, dd, $J=11.3, 9.8$ Hz, H_a-2)의 methylene 신호, δ 2.95 (1H, m, H-3)의 methine 신호 그리고 δ 3.37 (1H, dd, $J=13.8, 4.4$ Hz, H_b-9)와 2.61 (1H, dd, $J=13.5, 10.2$ Hz, H_a-9)의 methylene 신호가 나타남으로써 전형적인 3-benzyl-4-chromanone 형태의 5,7-dimethoxy-3-(2-methoxybenzyl)chroman-4-one 임을 확인하였다. 이 물질은 현재까지 보고되지 않은 신규의 homoisoflavonid 유도체이다.

따라서 A 및 B-ring 의 치환형태를 다르게 함으로써 다양한 homoisoflavonoids 를 합성할 수 있을 것으로 사료된다.

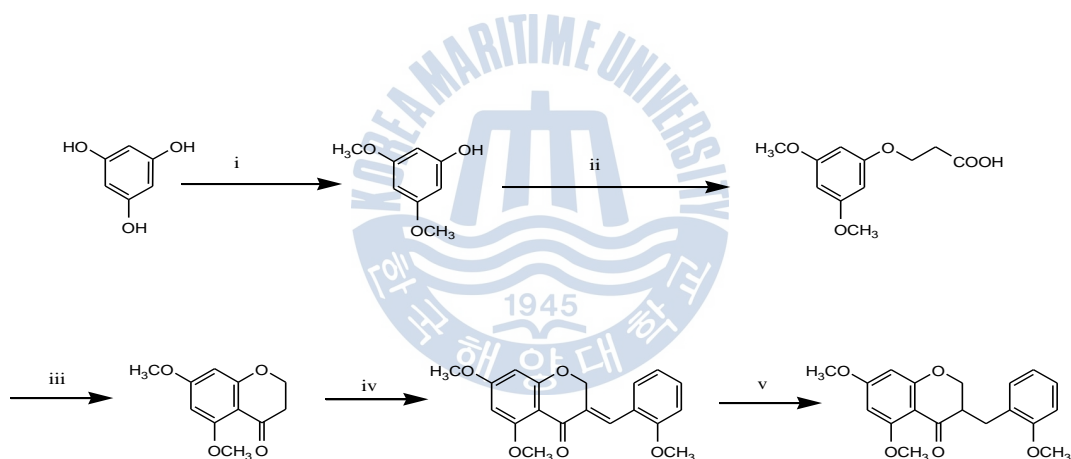


Figure 11. Reagent and condition for homoisoflavonoids synthesis. (i) NaH, Iodomethane, DMF, rt, 24h, (ii) NaH, 3-bromopropionic acid, DMF, rt, 24h, (iii) polyphosphoric acid, 70-75 °C, 2h, (iv) 2-methoxybenzaldehyde, piperidine, 120 °C, 2-4h, (v) 9-BBN/Pb-Catalyst, 0-25 °C

3-(3,5-Dimethoxyphenoxy)propanoic acid : $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 2.83 (2H, t, $J=6.3$ Hz, H-2), 3.76 (6H, s, Ar-OMe-6,8), 4.20 (2H, t, $J=6.3$ Hz, H-3) and 6.07 (3H, s, H-5, H-7, H-9). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : 34.3 (C-2), 55.4 (6-OMe and 8-OMe), 63.1 (C-3), 93.4 (C-7), 93.4 (C-5 and C-9), 160.1 (C-4), 161.3 (C-8) and 176.8 (C-1)

5,7-Dimethoxychroman-4-one : $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : 2.71 (2H, t, $J=6.4$ Hz, H-3), 3.81 (3H, s, Ar-OMe-7), 3.87 (3H, s, Ar-OMe-5), 4.43 (2H, t, $J=6.4$ Hz, H-2) and 6.03 (2H, s, H-6 & H-8). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : 38.8 (C-3), 55.6 (C-7-OMe), 56.1 (C-5-OMe), 66.8 (C-2), 92.8 (C-8), 93.3 (C-6), 106.3 (C-4a), 162.2 (C-5), 165.1 (C-8a), 165.6 (C-7) and 188.9 (C-4).

5,7-methoxyl-3-(2-methoxybenzylidene)chroman-4-one : $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : 3.80 (3H, s, Ar-OMe-2'), 3.82 (3H, s, Ar-OMe-5), 3.90 (3H, s, Ar-OMe-7), 5.10 (2H, d, $J=1.7$ Hz, H-2), 6.04 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-8), 6.10 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-6), 6.89 (1H, m, H-3'), 6.98 (1H, m, H-5') 7.00 (1H, m, 6'), 7.33 (1H, brt, $J=8.5$ Hz, H-4') $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : 55.5 (C-7-OMe), 55.6 (C-5-OMe), 56.2 (C-2'-OMe), 67.9 (C-2), 93.5 (C-6), 93.6 (C-8), 107.3 (C-4a), 110.8 (C-3'), 120.1 (C-5'), 123.9 (C-1'), 131.7 (C-3), 132.2 (C-4'), 157.8 (C-2'), 162.8 (C-8a), 164.7 (C-5), 165.5 (C-7), 179.6 (C-4)

5,7-dimethoxyl-3-(2-methoxybenzyl)chroman-4-one : $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : 2.95 (1H, m, H-3), 2.61 (1H, dd, $J=13.5, 10.2$ Hz, H_a -9), 3.37 (1H, dd, $J=13.8, 4.4$ Hz, H_b -9), 3.80 (3H, s, Ar-OMe-2'), 3.81 (3H, s, Ar-OMe-5), 3.88 (3H, s, Ar-OMe-7), 4.09 (1H, dd, $J=11.3, 9.8$ Hz, H_a -2), 4.26 (1H, dd,

$J=11.3, 4.7$ Hz, H_b-2), 6.02 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-8), 6.05 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-6), 6.84 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-3'), 6.88 (1H, td, $J=7.4, 1.1$ Hz, H-5'), 7.17 (1H, td, $J=7.2, 1.4$ Hz, H-6'), 7.22 (1H, dd, $J=7.3, 8.0$ Hz, H-4'),
 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : $27.4(\text{C-9})$, $46.5(\text{C-3})$, $55.2(\text{C-7-OMe})$, $55.5(\text{C-5-OMe})$, $56.1(\text{C-2'-OMe})$, $69.7(\text{C-2})$, $92.7(\text{C-6})$, $93.0(\text{C-8})$, $105.5(\text{C-4a})$, $110.2(\text{C-3'})$, $120.3(\text{C-5'})$, $127.1(\text{C-1'})$, $127.7(\text{C-3})$, $131.0(\text{C-4'})$, $157.5(\text{C-2'})$, $162.2(\text{C-8a})$, $164.8(\text{C-5})$, $165.3(\text{C-7})$, $191.5(\text{C-4})$



3.2. *S. siliquastrum* 으로부터 분리된 이차대사산물의 생리활성

3.2.1. *S. siliquastrum* 으로부터 분리한 compounds 1-3 의 인체유래의 암세포 증식억제효과

파배기모자반(*S. siliquastrum*)으로부터 분리된 3 개의 chromanol 화합물을 이용하여 HT1080 인체 섬유육종 세포 (HT1080 human fibrosarcoma cells), HT-29 인체 결장암세포 (HT-29 colon adenocarcinoma cells), AGS 인체 위암세포 (AGS human gastric carcinoma cells), MCF-7 인체 유방암 세포 (MCF-7 human breast cancer)의 세포 성장에 미치는 영향을 관찰하였으며, 결과는 시료를 처리하지 않은 대조군을 기준으로 하여 백분율(%)로 나타내었다.

Figure 12 에 나타난 결과와 같이 compound 1 과 3 이 4 가지 암세포의 증식을

뛰어나게 억제하는 효과를 나타내었다. 특히, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 compound 1 은 HT1080, HT-29, AGS, MCF-7 세포의 증식을 각각 93, 84, 95, 57% 저해하는 것으로 나타났으며, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 모든 세포의 증식을 50% 가량 억제하는 것으로 나타났다. HT-29 세포의 경우, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 40% 이상 억제하는 우수한 효과를 보였다. Compound 3 의 경우, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 사용된 모든 세포의 성장을 각각 90(HT1080), 80(AGS), 92(HT-29), 93(MCF-7)% 억제하였지만 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 급격히 그 효과가 줄어들었다.

Compound 2 의 경우, MCF-7 세포증식을 억제하는 효과는 없었지만 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 HT1080, HT-29 세포의 성장을 다소 감소시키는 것으로 나타났으며, AGS 세포의 경우는, 65% 가량 증식을 억제하는 것으로 나타났다.

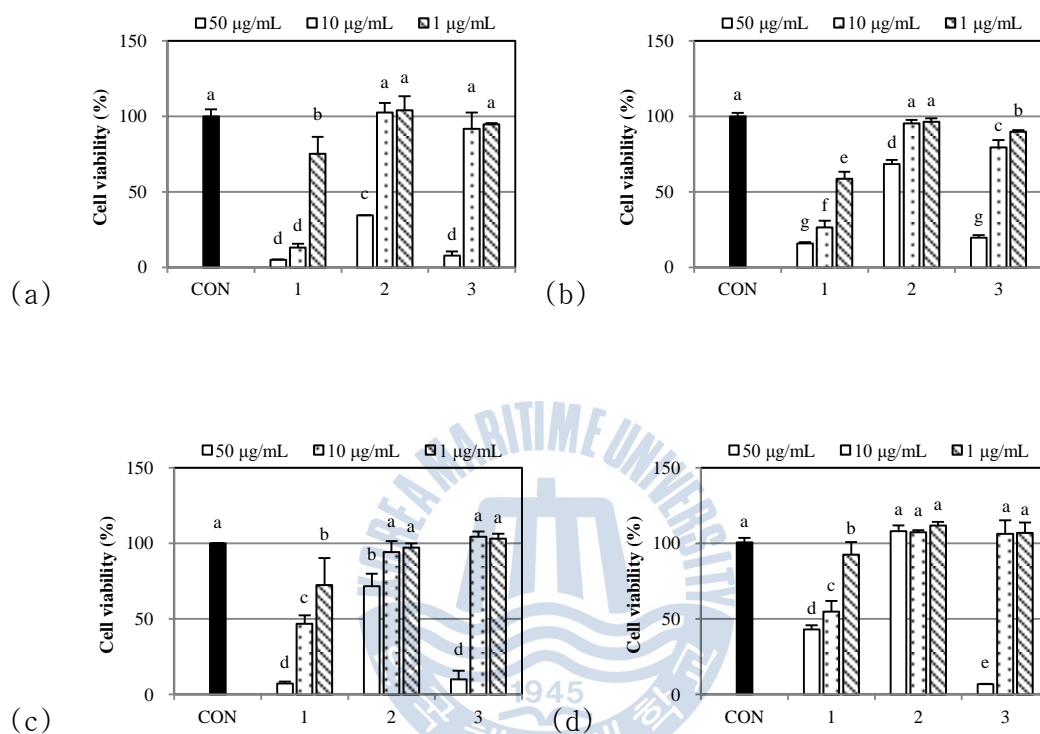


Figure 12. Antiproliferative effects of compounds 1-3 isolated from *S. siliquastrum* in AGS (a), HT-29 (b), HT-1080 (c), and MCF-7 (d) cells. ^{a-d} Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan' s multiple range test. Values are means \pm SD (n=3).

3.2.2. *S. siliquastrum* 으로부터 분리한 compounds 1-3 의 항산화 효과

3.2.2.1. DPPH radical 소거 효과

분리된 3 개의 chromanol 화합물이 가지는 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. 대조군으로 L-ascrobic acid 와 BHA 을 사용하였으며, 50, 25, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 측정하였다.

DPPH radial 소거능 검색 결과(Figure 13), 대조군인 L-ascrobic acid 는 50, 25, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 78, 67, 55%의 소거 효과를 나타냈으며, 합성항산화제인 BHA 도 65, 49, 32%의 소거율을 보여주었다. 분리된 3 개의 화합물 모두 농도 의존적으로 DPPH radical 을 소거하는 것으로 나타났으며, 이는 합성 항산화제인 BHA 와 견줄만한 효과를 보여주었다. 특히, compound 1 의 경우, 각 농도에서 68, 51, 34%의 DPPH radical 소거율을 보임으로서 합성 항산화제인 BHA 보다 다소 높은 효과를 나타내었다.

3.2.2.2. Peroxynitrite 소거 효과

Authentic ONOO^- 와 SIN-1에 대한 3종 화합물의 소거 효과는 Kooy 등(Kooy et al. 1994)의 방법을 이용하여 검색하였으며, ONOO^- 소거율은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다. 대조군으로 L-ascrobic acid와 penicillamine를 사용하였으며, 50, 25, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 검색하였다.

SIN-1 을 처리한 결과 대조군 L-ascrobic acid 와 penicillamine 모두 100%에 해당하는 소거 활성 효과를 보였다. 분리된 compounds 1-3 은 모두 농도

의존적인 peroxynitrite 소거 활성을 보여주었다. Figure 14 에서 보듯이 compound 3 이 가장 효과적으로 소거하는 것을 보여주었는데, SIN-1 분해에 의해 생성된 peroxynitrite 의 경우에 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 96% 가량 소거하였으며, 25 $\mu\text{g/mL}$ 에서도 90% 가량을 소거하는 우수한 활성을 보였다. Compound 1 또한 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 76%의 소거율을 보였으며 25, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 72, 58%의 소거율을 나타냈다. Authentic peroxynitrite 에 대한 소거 활성은 농도 의존적으로 compound 1 이 77, 61, 43%의 가장 높은 소거효과를 나타냈으며, Compounds 2 와 3 은 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 40, 38% 정도의 소거율을 나타내었다(Figure 14).

요약하면, SIN-1 과 authentic peroxynitrite 에 대한 소거능 측정 결과, compound 1 이 가장 효과적으로 두 peroxynitrite 를 소거하는 것으로 나타났으며, compound 3 은 SIN-1 분해에 의해 생성된 peroxynitrite 만을 효과적으로 소거하는 것을 확인하였다.

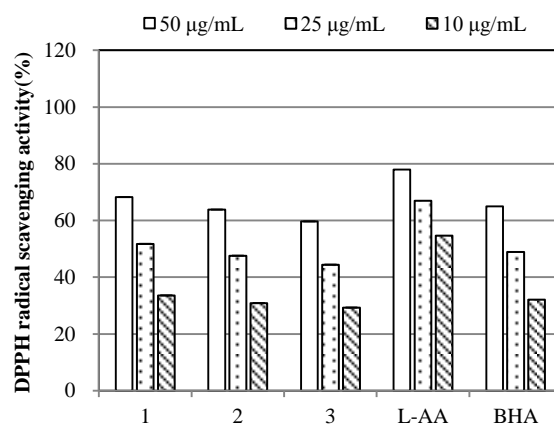
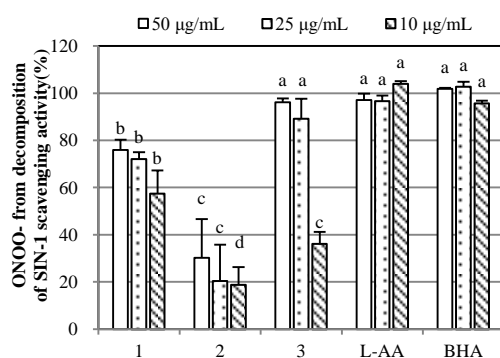
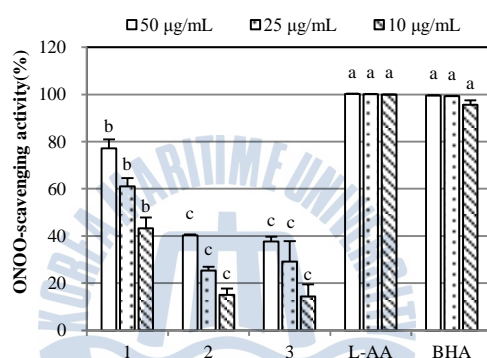


Figure 13. Scavenging effects of compounds **1-3** from *Sagassum siliquastrum* on DPPH radical.





(a)



(b)

Figure 14. Scavenging effect of compounds 1-3 from *Sargassum siliquastrum* on ONOO⁻ from SIN-1(a) and authentic ONOO⁻ (b). ^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are means \pm SD ($n=3$).

3.2.2.3. 세포 독성 효과

3 개의 chromanol 화합물에 대한 세포 수준의 항산화 효과를 검색하기전에 화합물이 세포의 생존에 영향을 미치지 않은 농도 범위를 찾기위하여 MTT assay 를 이용한 세포독성을 검색하였다. 그 결과, figure 15 에서 볼수 있듯이 10 μ g/mL 의 농도에서 세포 생존에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났으며, 이를 바탕으로 HT1080 세포를 이용하여 항산화 활성(ROS, GSH, 지질과산화) 검색을 실시하였다.

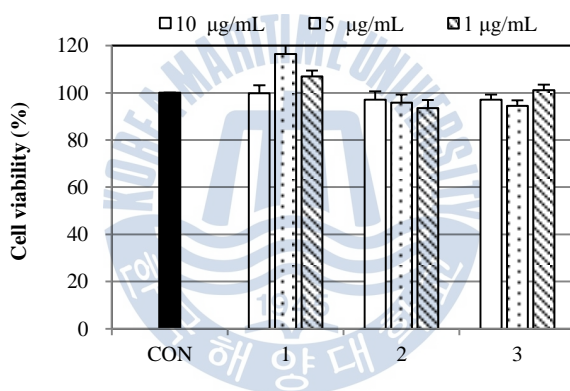


Figure 15. Effect of compounds 1-3 from *S. siliquastrum* on viability of HT1080 cells.

3.2.2.4. 활성 산소종(ROS) 소거 효과

Compounds **1-3** 의 세포내 활성 산소종 소거 효과는 형광염료인 DCF-DA 를 이용하여 측정하였다(Figure 16). DCF-DA 는 세포내 esterase 효소에 의해 DCFH 로 환원되고, 이는 세포내에 생성된 유리 라디칼과 반응하여 형광물질인 DCF 로 산화됨으로서 형광을 발생시킨다. 이때 생성된 형광정도를 측정하여 시료의 유리라디칼 소거능을 확인할 수 있다(Curtin et al 2002; Gomes et al 2005). 세포내 자유라디칼의 생성은 H_2O_2 를 이용하여 유도하였으며, 시료와 H_2O_2 모두 첨가하지 않은 것을 blank, 시료를 첨가하지 않고 H_2O_2 만을 첨가한 것을 control 로 하여 백분율(%)로 나타내었다.

Figure 16 에 따르면 사용된 모든 화합물은 농도의존적으로 세포내 생성된 활성산소종을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 10 $\mu g/mL$ 의 농도에서 3 종의 화합물 모두 80% 가량 ROS 를 감소시켰으며, 2(88%)>3(84%)>1(78%)의 순서로 효과를 보였다. 5 $\mu g/mL$ 의 농도에서도 2(82%)>3(82%)>1(56%)로 효과적으로 활성 산소종을 제거하는 것으로 나타났다. compound **2** 의 경우, 1 $\mu g/mL$ 의 농도에 76%의 활성 산소종 소거효과를 나타냄으로서 3 종의 화합물 중 가장 높은 효과를 보였다.

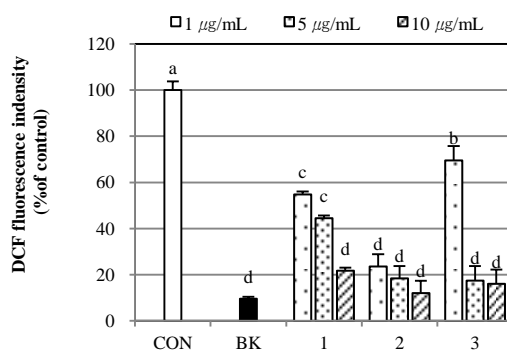


Figure 16. Effects of compounds **1-3** isolated from *S. siliquastrum* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. The cells were incubated with different concentrations (10, 5, and 1 $\mu\text{g/mL}$) of the compounds **1-3** for 120 min. DCF fluorescence was measured at $\lambda_{\text{excitation}}=485\text{ nm}$ and $\lambda_{\text{emission}}=528\text{ nm}$. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are means \pm SD ($n=3$).

3.2.2.5. 지질과산화 억제 효과

세포내 지질과산화의 정도는 TBARS 법을 이용하여 측정하였다(Heath and Packer 1968). 유지의 산화로 생성된 malonedialdehyde 는 두 분자의 TBA (thiobarbituric acid)와 반응하여 적자색의 복합체를 형성한다. 이 때, 538 nm 에서 산화생성물의 흡광도를 측정함으로써, 지질과산화 정도를 측정할 수 있다. 세포내 산화는 2 mM H_2O_2 와 0.1 M $FeSO_4$ 을 이용하여 유도하였으며, 시료를 첨가하지 않고 H_2O_2 만 첨가한 대조군과 비교하여 산화 억제효과를 백분율(%)로 나타내었다. 대조군과 비교시, 3 종의 화합물 모두 지질산화를 30% 가량 억제하는 것으로 나타났으며, 화합물간의 큰 억제능 차이는 보이지 않았다(Figure 17).

3.2.2.6. 세포내 GSH(glutathion) 함량

세포내에 축적된 GSH(glutathion) 함량은 thiol-staining reagent 인 mBBR (monobromobiman)을 이용하여 측정하였다. GSH 는 세 개의 아미노산으로 이루어진 tripeptide(cystein, glutamic acid, glycine)로써, sulfhydryl radical 을 가지고 있어, 세포내 산화생성물을 제거 하는 역할을 한다(Sies, 1999; Curtin et al 2002; Watson and Jones 2003). 따라서 비형광성 물질인 mBBR 과 이들이 세포내에서 결합하여 형광을 나타내므로, 그 정도를 측정하여 세포내 GSH 함량을 나타내었다. 시료를 첨가하지 않은 control 과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다. Figure 17 에서 볼수 있듯이 compound 1 과 3 에서는

GSH 함량이 증가되지 않았으며, compound 2 의 경우, GSH 가 27% 가량 증가하였다.

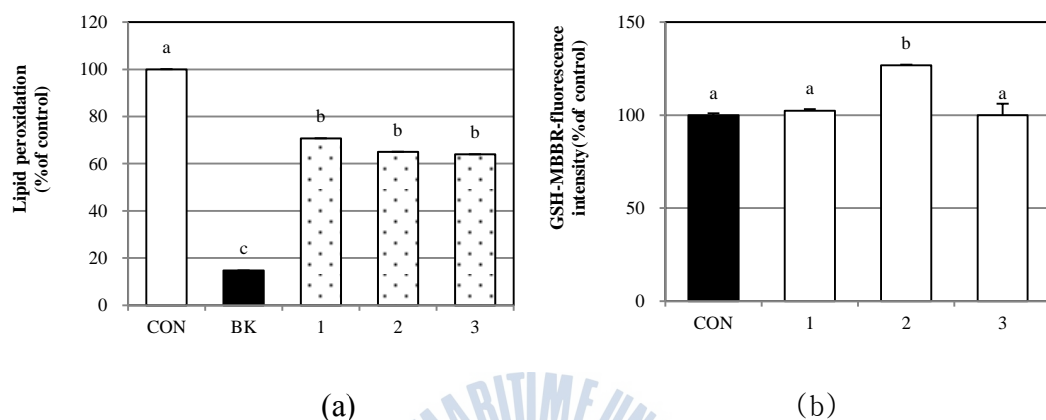


Figure 17. Effect of compounds 1-3 isolated from *S. siliquastrum* on (a) membrane lipid peroxidation at 5 $\mu\text{g/mL}$. Membrane lipid peroxidation determined by TBARS method. HT-1080 cells were exposed to $\cdot\text{OH}$ generated via Fenton' reaction and oxidation products of membrane lipids which can react with TBA were determined spectroscopically at 528 nm and (b) regulation of GSH levels in HT-1080 cells. The cells were incubated with 5 $\mu\text{g/mL}$ concentrations of the compounds 1-3 for 120 min. Cellular GSH levels were determined using mBBR as a thiol-staining reagent according to the method described in the text measuring mBBR-GSH fluorescence intensity at $\lambda_{\text{excitation}}=360$ nm and $\lambda_{\text{emission}}=465$ nm. ^{a-c} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan' s multiple range test. Values are means \pm SD ($n=3$).

3.3. *P. oleracea*의 추출물 및 분획물의 암세포 증식억제효과

쇠비름의 항암 생리활성 물질탐색을 위한 기초 연구로서 쇠비름 추출물 및 용매 분획층을 이용하여 HT1080, HT-29, AGS, MCF-7 세포성장에 미치는 영향을 관찰하였다(Figure 18).

HT1080 인체 섬유육종 세포에 쇠비름의 용매별 분획물을 농도별로 첨가하여 암세포 증식 억제 정도를 보았다. 쇠비름의 조추출물에서 100, 50 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 52, 36, 19%로 HT1080 세포의 증식을 억제하였다. 그리고 조추출물을 극성에 따라 분획한 용매분획층 중 85%aq. MeOH 층만이 세포증식을 억제하는 효과를 보여주었다. HT-29 세포에 대한 세포 증식 억제효과 결과 역시 HT1080 과 유사하게 85%aq. MeOH 층에서 세포증식억제 효과가 관찰되었으며, 이와 함께 *n*-hexane 층에서도 세포 증식억제효과를 나타내었다. 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 85%aq. MeOH 층과 *n*-hexane 층에서 95%이상 억제하였으며, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 각각 34와 54%의 억제율을 나타냈다.

AGS 세포의 경우, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 모든 시료가 암세포 증식 효과를 나타냈으며, 85%aq. MeOH 층과 *n*-hexane 층의 경우, 100와 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 두드러진 억제 효과를 보였다. 85%aq. MeOH 층의 경우, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 81% 가량의 세포 성장을 억제하였으며, 농도 의존적으로 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 76%, 49%의 효과를 나타냈다. *n*-Hexane 층의 경우, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 79%에 가까운 세포 증식억제 효과를 나타냈으며, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 71%, 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 68%까지 세포 증식을 억제하였다.

하지만 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 그들의 활성이 급격히 감소함을 확인할 수 있었다.

MCF-7 의 세포의 경우, AGS 세포와 유사하게 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 모든 시료가 활성을 나타냈으며, 85%aq. MeOH 과 *n*-hexane 의 경우, 농도의존적으로 암세포 증식을 억제하는 것으로 나타났다. 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각의 분획층은 82%, 90%의 높은 활성을 나타냈으며, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 58%, 75%의 활성을 확인할 수 있었다. *n*-Hexane 층의 경우, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 50%가량 세포 성장을 억제하는 것을 관찰할 수 있었다.

85% aq.MeOH 층의 경우, 모든 세포에서 우수한 세포 증식억제 효과를 보였으며, *n*-hexane 또한 HT-1080 세포를 제외한 모든 세포에서 그들의 증식을 억제하는 것으로 나타났다.



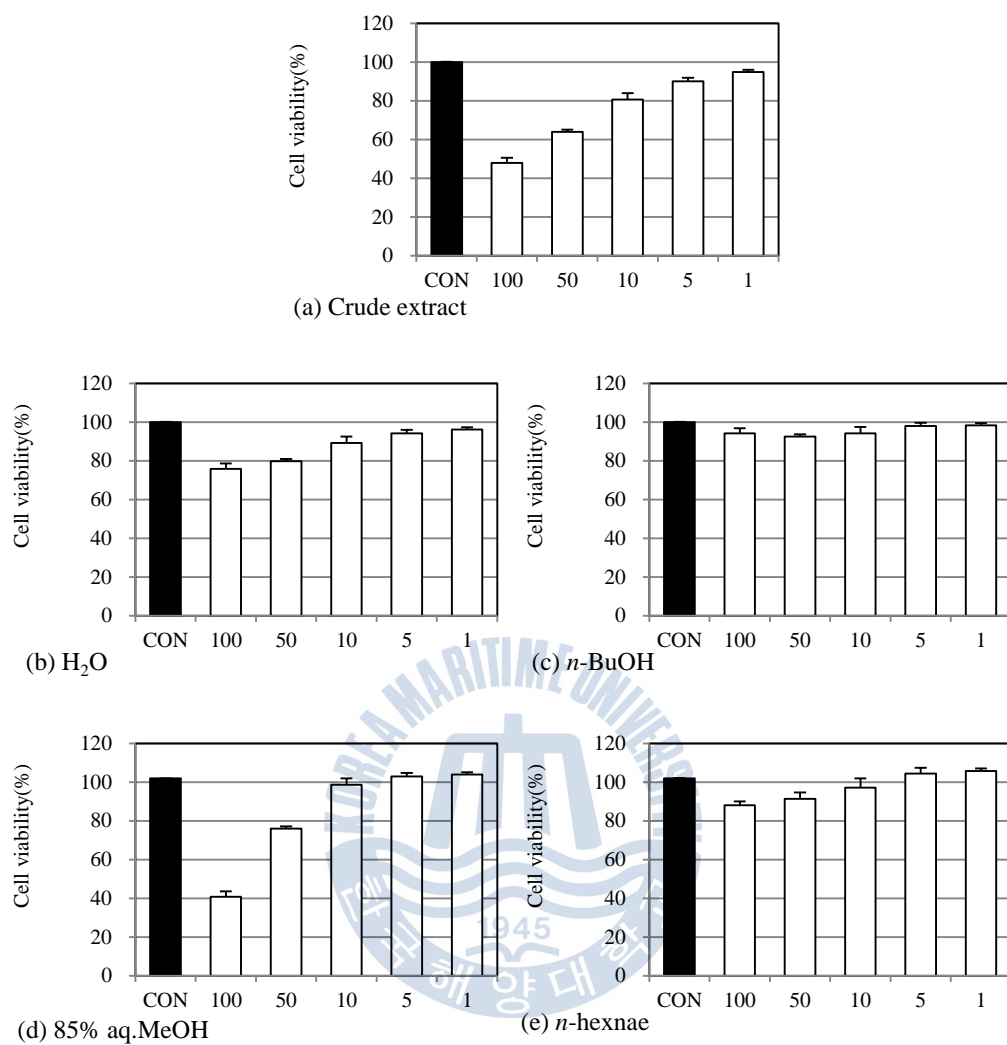


Figure 18. Effect of crude extract and its solvent fractions from *P. oleracea* on viability of HT-1080 cells.

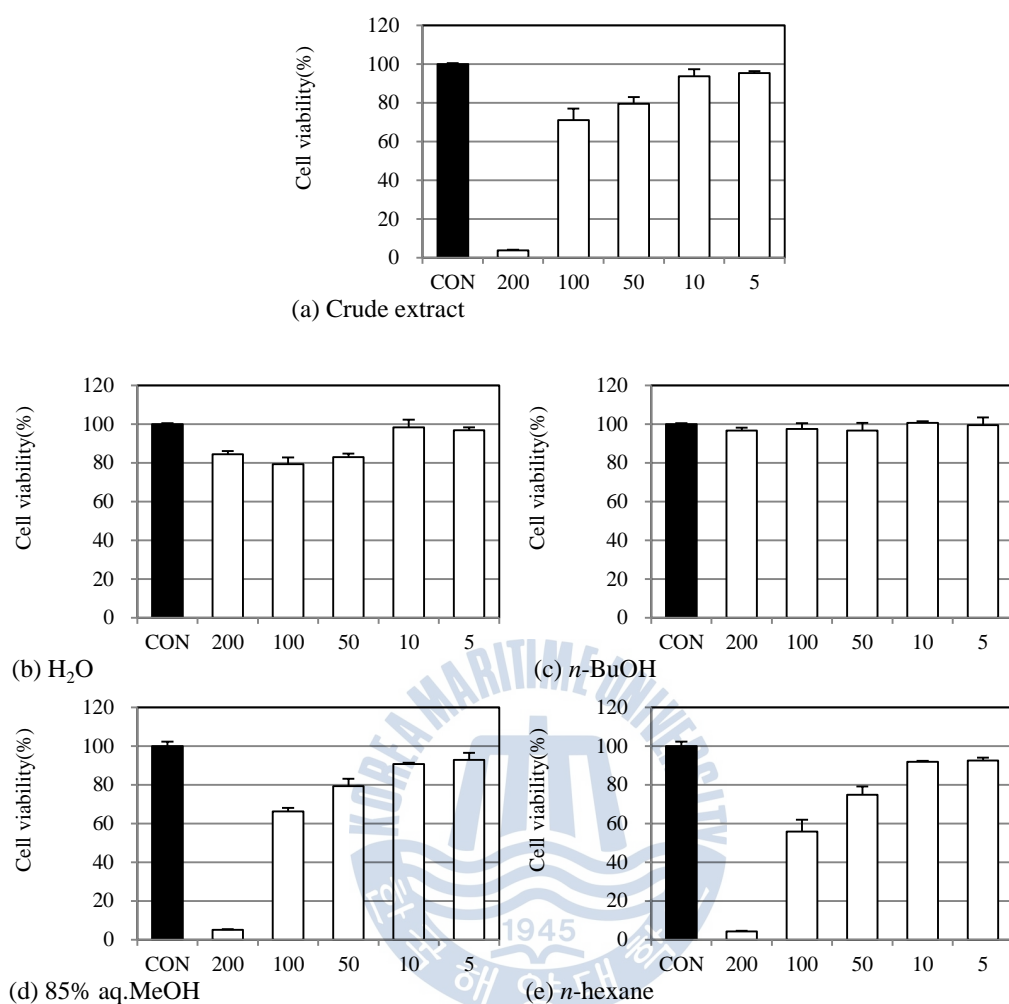


Figure 19. Effect of crude extract and its solvent fractions from *P. oleracea* on viability of HT-29 cells.

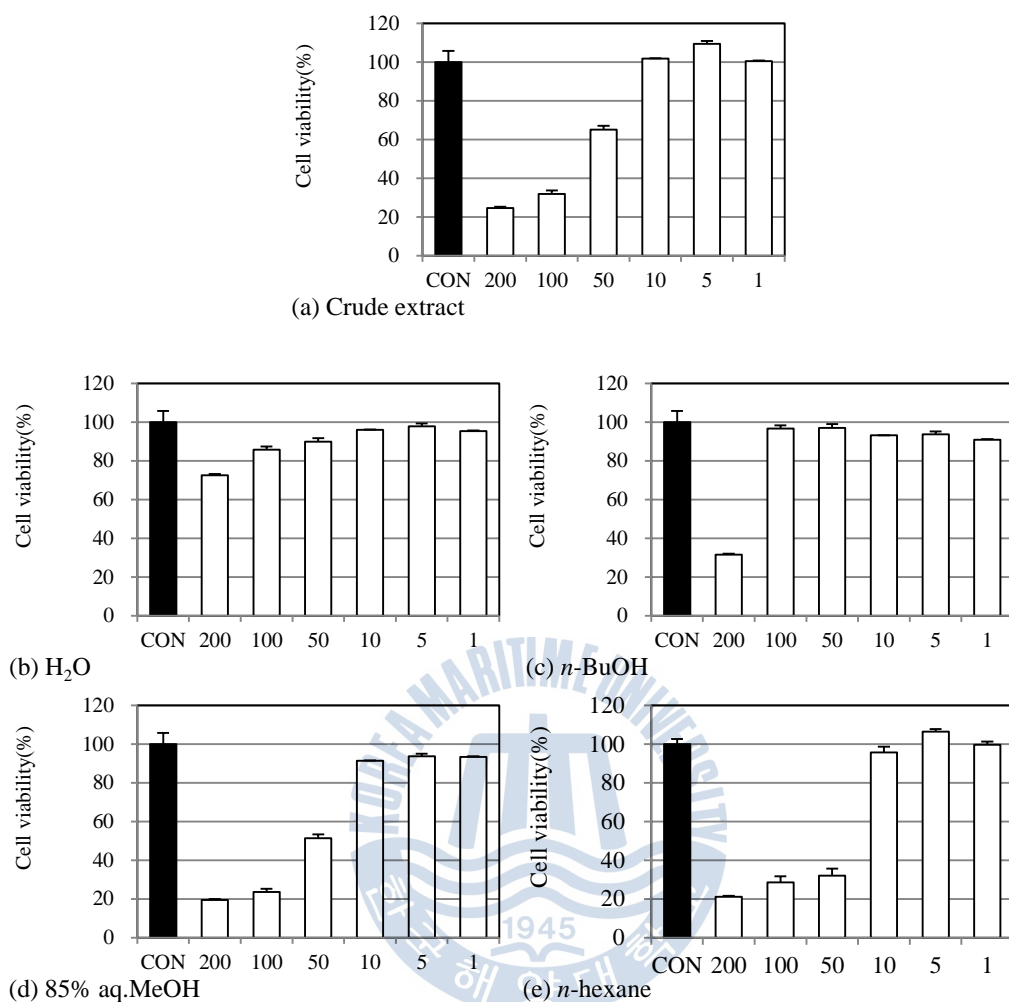


Figure 20. Effect of crude extract and its solvent fractions from *P. oleracea* on viability of AGS cells.

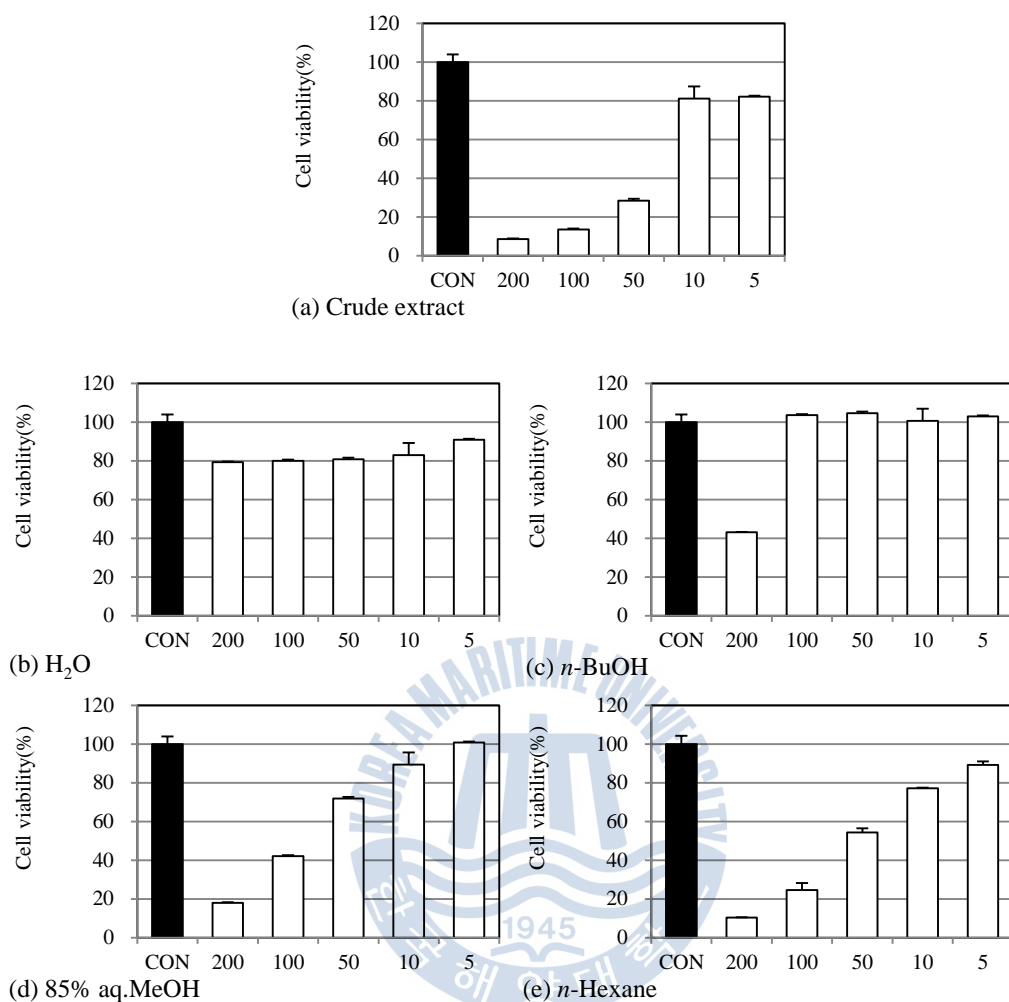


Figure 21. Effect of crude extract and its solvent fractions from *P. oleracea* on viability of MCF-7 cells.

3.4. *P. oleracea*로부터 분리된 이차대사산물의 생리활성

3.4.1. *P. oleracea*로부터 분리된 compounds 7-10, 12-13의 암세포 증식억제효과

쇠비름(*P. oleracea*)로부터 분리한 homoisoflavonoids 화합물 7-10, 12-13을 이용하여 HT1080, HT-29, AGS, MCF-7 세포에 대한 세포 증식억제효과를 관찰하였으며, 결과는 시료를 처리하지 않은 대조군을 기준으로 백분율(%)로 나타내었다.

HT1080 세포 증식억제 효과를 관찰한 결과(a), 대부분의 화합물에서 세포증식억제 효과가 나타나지 않았지만 compound 10의 경우, 100 μ M에서 62% 가량 HT1080 세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다. HT-29 세포에서도(b) compound 10만 세포 성장을 저해하는 것으로 나타났으며, 10 μ M에서도 28% 정도 세포 증식억제 효과를 확인하였다. AGS 세포의 경우(c), 다른 세포와 다르게 compound 10와 함께 12, 13 화합물 또한 AGS 세포를 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 100 μ M의 농도에서 12번과 13번 화합물은 69%의 억제율을 보였으며, compound 13의 경우, 50 μ M에서도 61% 가량 세포 증식을 억제하는 것으로 나타났다. MCF-7의 유방암세포의 경우(d), HT1080 세포와 HT-29 세포와 유사하게 compound 10만이 100 μ M의 농도에서 50% 가량의 억제율을 확인하였으며, 50과 10 μ M에서도 각각 28%, 26%의 억제율을 확인하였다.

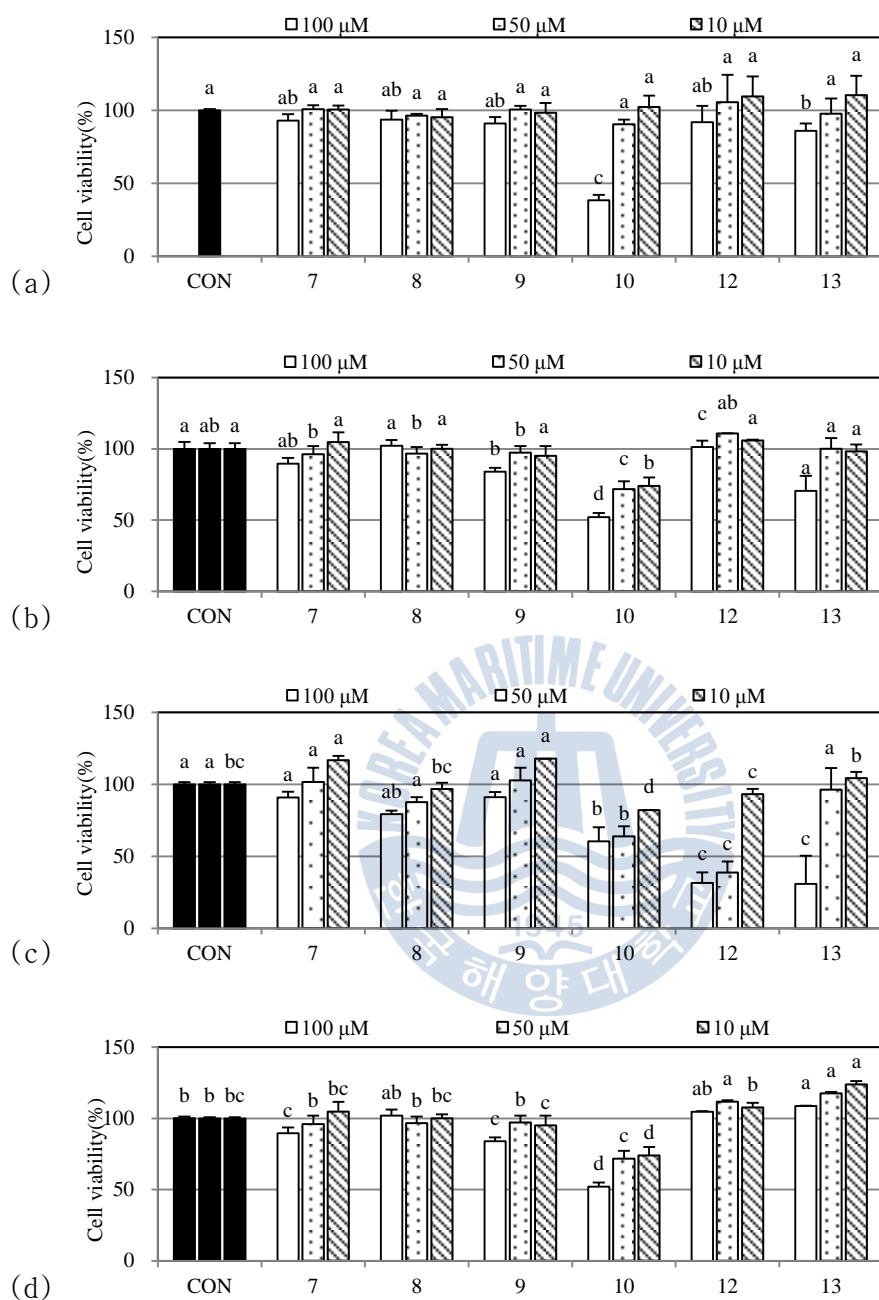


Figure 22. Antiproliferative effects of compounds 7-10, and 12-13 isolated from *P. oleracea* in HT-1080 (a), HT-29 (b), AGS (c), and MCF-7 (d) cells. ^{a-d} Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test. Values are means ± SD (n=3).

3.4.2. *P. oleracea*로부터 분리된 compounds 7-10 및 12-13의 활성 산소종(ROS)

소거 효과

Compounds 7-10 및 12-13에 대한 세포내 활성 산화종 소거 효과 결과, 사용된 모든 화합물은 세포내 생성된 활성산화종을 소거하는 것으로 나타났다. 100 μ M의 농도에서 compound 7이 59% 정도의 세포내 ROS를 제거하는 것으로 나타났으며, 차순으로 compound 9(56%)>8(52%)>10(44%)>12(22%)>13(18%)의 소거율을 보여주었다. compound 7의 경우, 1 μ M 농도에서도 41% 정도의 ROS 소거율을 보여주었으며, 동일 농도에서 compound 9과 10 또한 각각 30%와 33%로 세포내 생성된 ROS를 효과적으로 제거하는 것으로 나타났다.



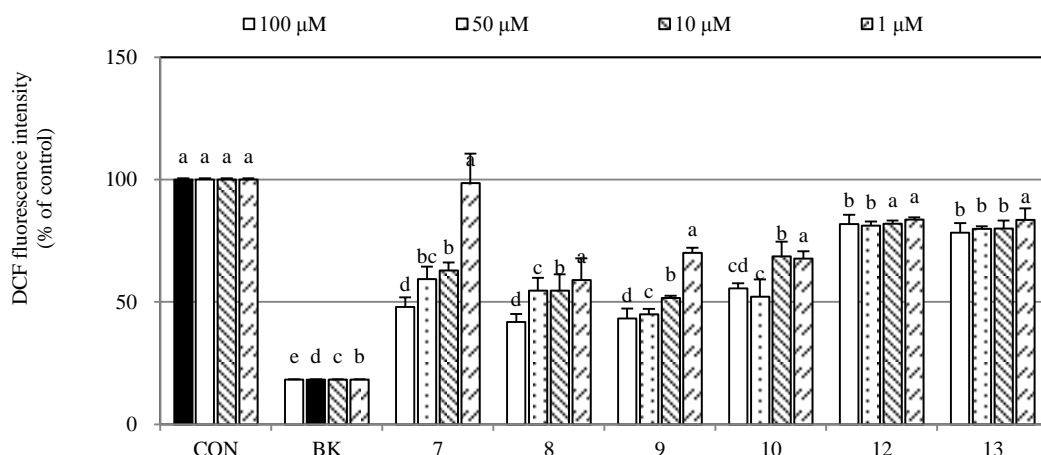


Figure 23. Effects of compounds **7-10**, and **12-13** isolated from *P. oleracea* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. The cells were incubated with different concentrations (100, 50, 10, and 1 μ g/mL) of the compounds **7-10**, **12-13** for 120 min. DCF fluorescence was measured at $\lambda_{\text{excitation}}=485$ nm and $\lambda_{\text{emission}}=528$ nm. ^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are means \pm SD ($n=3$).

3.4.3. *P. oleracea* 으로부터 분리한 compounds 7-10 의 항비만 효과

3.4.3.1. 3T3-L1 전구 지방세포에서의 세포 분화능 측정

분화된 3T3-L1 지방세포에서 *P. oleracea*로부터 분리한 4종의 화합물이 생성된 지방구에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Oil Red O 시약을 사용해서 형성된 지방구를 관찰하였다. Sample의 농도는 10, 1 μ M씩 각각 처리하였으며 sample을 처리하지 않은 대조군(CON)을 기준으로 지방의 축적 정도를 백분율로 나타내었다.

Figure 24 은 세포내에 형성된 지방구를 관찰한 것으로 대조군에 비해 분리된 화합물을 처리한 경우, 세포내 지방구가 감소한 것을 볼 수 있었다. Figure 25 는 지방구에 염색된 Oil Red O 시약을 isopropyl alcohol에 녹여 흡광도를 측정한 결과로서, 10 μ M 농도에서 8(33%) > 10(27%) > 7(25%) > 9(21%) 로 대조군에 비해 세포내 지방구의 축적이 감소됨을 확인하였다.

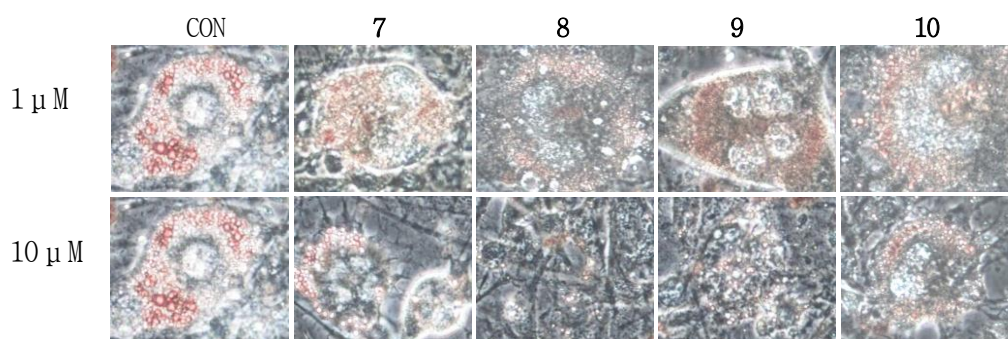


Figure 24. Observation of lipid droplets stained with Oil Red O staining in 3T3-L1 adipocyte. CON: fully differentiated control adipocytes (0.5 mM methylisobutylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, and 5 μ g/ml insulin)

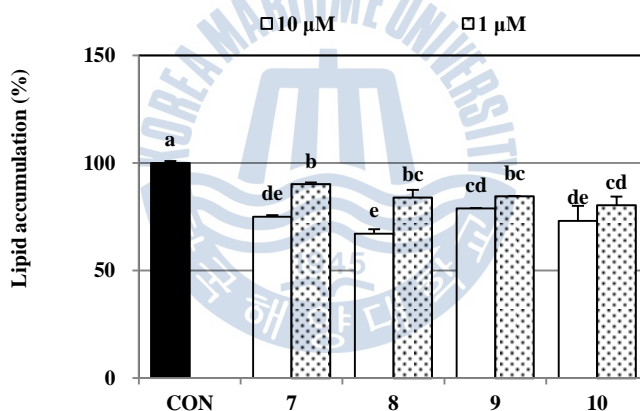


Figure 25. Effect of compounds 7-10 from *Portulaca oleracea* on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes by Oil-Red O staining. CON: fully differentiated control adipocytes (0.5 mM methylisobutylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, and 5 μ g/ml insulin) ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test.

3.4.3.2. Glucose 소비 측정

Glucose는 glucose transporter 4(Glut-4)에 의해 지방세포로 흡수되어 glycerol로 전환되고 지방산과 합쳐져 TG로 합성되어 지방구를 형성하거나 에너지 합성에 쓰이게 된다. Glucose를 수송하는 Glut-4는 인슐린에 의해서 촉진되어 세포로의 glucose 유입을 증가시키는데 (Shepherd PR et al. 1999) 지방세포가 비만세포로 전환되면 인슐린 저항성이 증가되어 Glut-4의 활성이 억제됨으로서 세포내 glucose의 유입이 감소된다.

지방세포내에 화합물에 의한 glucose 유입을 확인하기 위하여 100, 10, 1 μ M의 농도로 화합물을 처리하여 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 나타냈다(Figure 26) 처리한 모든 시료는 대조군에 비해서 유의적 차이를 보였으며, 100 μ M 농도에서 9(31%) > 10(28%) > 7(24%) = 8(24%)의 순서로 glucose 함량이 감소하였고, 10 μ M 에서는 10(29%) > 9(26%) > 7(22%) = 8(22%) 순으로 나타났다. 1 μ M에서는 10(25%) > 9(18%) > 8(15%) > 7(10%)으로 순으로 나타냈으며 10의 경우, 1 μ M농도에서도 20%이상의 감소효과를 보였다.

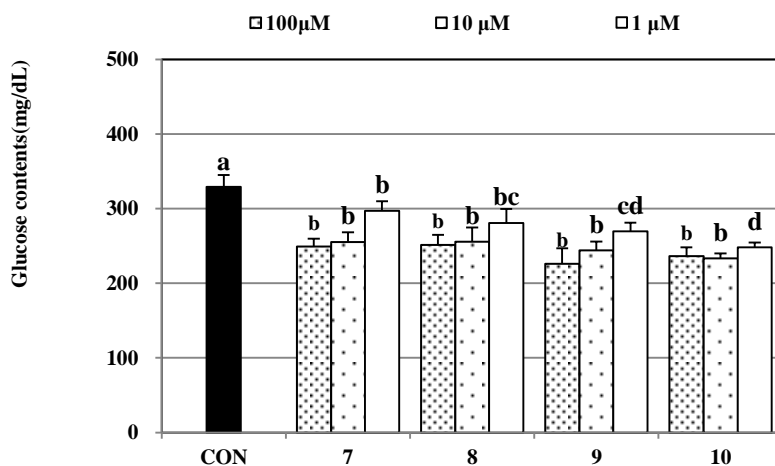


Figure 26. Effects of compounds 7–10 from *Portulaca oleracea* on glucose consumption. ^{a–d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test. CON: fully differentiated control adipocytes (0.5 mM methylisobutylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, and 5 μ g/ml insulin)

3.4.3.3. Glycerol 분비 측정

쇠비름으로 분리된 4종의 화합물이 TG의 분해에 미치는 영향을 알아보기 위해 free glycerol 함량을 측정하였다. 시료의 농도는 100, 10, 1 μ M로 처리하였으며 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 나타내었다.

그 결과(Figure 27), 모든 시료에서 유의적으로 glycerol 분비량이 증가하는 것을 확인하였다. 100 μ M에서는 10번 화합물이 대조군에 비해 84% 이상으로 화합물중에 glycerol의 분비가 가장 높았으며, 9번의 경우, 64%, 2번은 41%, 1번은 16% 이상으로 높게 나타났다. 10 μ M에서는 10번 화합물이 61%로 가장 높게 나타났으며, 9(51%), 8(29%), 7(21%)의 순으로 glycerol 분비가 증가하였고, 1 μ M 농도에서 10(32%), 9(14%), 8(13%), 7(12%) 순으로 나타났다. 분리된 화합물 모두 대조군에 비해 glycerol의 분비가 증가됨으로써 세포내 축적된 TG를 분해하는 것을 확인하였다.

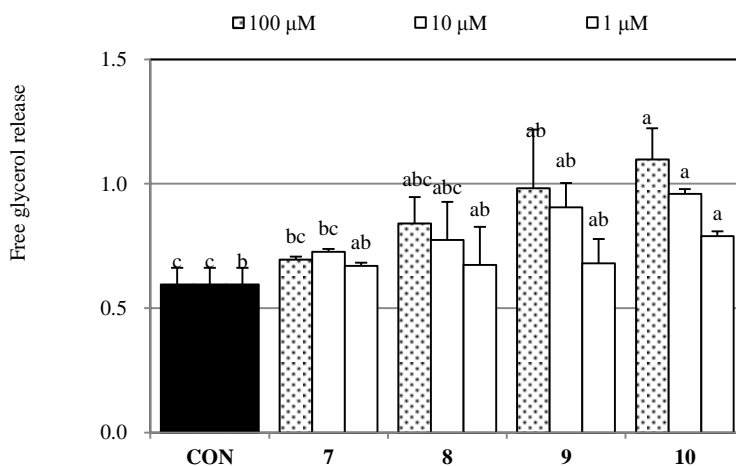
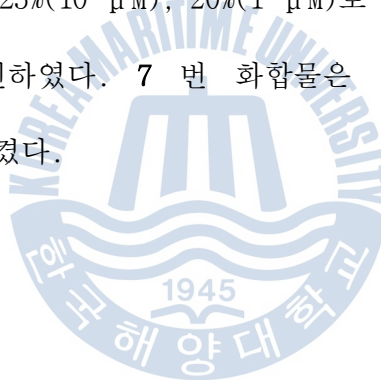


Figure.27. Effects of compounds 7-10 from *Portulaca oleracea cava* on glycerol secretion. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test. CON: fully differentiated control adipocytes (0.5 mM methylisobutylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, and 5 μ g/mL insulin)

3.4.3.4. Leptin 측정

지방세포에서 분비되는 leptin 은 시상하부에 작용하여 식욕 억제 및 에너지 소비를 증가시키고, 체내 지방분해를 촉진하는 효과를 나타내어 체지방의 항성성을 유지하는 역할을 하는 adipocytokine 이다(Campfield LA *et al.*, 1995). Leptin 의 분비량은 비만인의 체지방량에 비례하여 혈중 leptin 의 농도가 증가함으로서 지방축적의 정도를 나타내는 주요한 지표가 된다.

각각 화합물의 leptin 분비량은 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다. 그 결과, figure 28 에서 대조군과 비교시 8 번 화합물이 31%(100 μ M), 25%(10 μ M), 20%(1 μ M)로 농도의존적으로 leptin 의 분비를 감소시킴을 확인하였다. 7 번 화합물은 100 μ M 에서 13% 정도 leptin 의 분비가 감소시켰다.



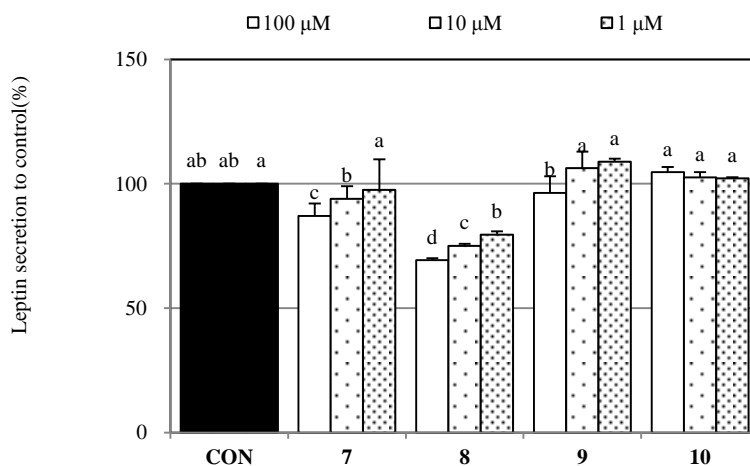


Figure 28. Effects of compounds 7-10 from *Portulaca olreacea* on leptin secretion. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test. CON: fully differentiated control adipocytes (0.5 mM methylisobutylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, and 5 μ g/ml insulin)

3.4.3.5. 비만 관련 유전자 발현 측정

쇠비름으로부터 분리한 화합물이 나타내는 지방축적의 감소가 지방생성 억제 및 지방 분해로 인한 것인지에 대한 상관관계를 확인하기 위하여 mRNA 유전자 발현 양상을 검토하였다.

3.4.3.5.1. 핵심 조절 전사인자 발현

지방전구세포에서 지방세포로의 분화는 세포가 confluence 상태가 되어 성장정지기에 접어들면 IBMX, dexamethasone, insulin을 첨가하여 유도 한다. 이때, 분화 초기 단계에서 C/EBP δ , β 가 발현되고 이는 PPAR γ 의 발현을 유도하여 분화가 계속적으로 이루어지게 한다. 또한 발현된 PPAR γ 는 지방세포의 분화 후기단계에서 C/EBP α 의 발현을 유도하게 된다. SREBP1c는 지방세포에서 콜레스테롤과 지방산 대사와 관련된 많은 유전자를 발현하는 전사인자(Brown, 1997)로서 분화과정의 초기단계에서 발현되어 PPAR γ 의 endogenous ligand 또는 activator 생성을 촉진시킴으로서 PPAR γ 의 전사 활성을 증가시킨다(Kim et al, 1999).

지방세포로의 분화시 발현되는 핵심 전사인자인 PPAR γ , SREBP1c, C/EBP α 의 mRNA 발현양상을 검토하여 쇠비름으로부터 분리된 화합물의 adipogenesis 억제 효과를 확인하였다. 화합물의 농도는 100, 10, 1 μ M로 처리하였으며, 화합물을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 mRNA 발현양을 확인하였다.

PPAR γ 유전자 발현 정도를 검토한 결과, 모든 화합물이 대조군과 비교시 유전자의 발현이 유의적으로 감소시켰으며, 그 중 compound 9이 100과 10 μ M 농도에서 40%이상 억제시킴을 확인하였다. C/EBP α 는 compound 9이 100과 10 μ M 농도에서 대조군과 비교시 30% 이상 억제하였으며, 1 μ M 농도에서는 유전자 발현을 억제하는 활성이 현저히 저하되는 것을 보였다. SREBP1c는 발현양상에서는 PPAR γ 과 유사하게 대조군과 비교시 모든 화합물이 유의적으로 유전자 발현을 감소시켰고, 특히 100 μ M 농도에서 모든 화합물이 40% 이상 발현을 억제하였으며, 그 중에서 compound 9과 10는 50%이상 발현을 억제시켰다.



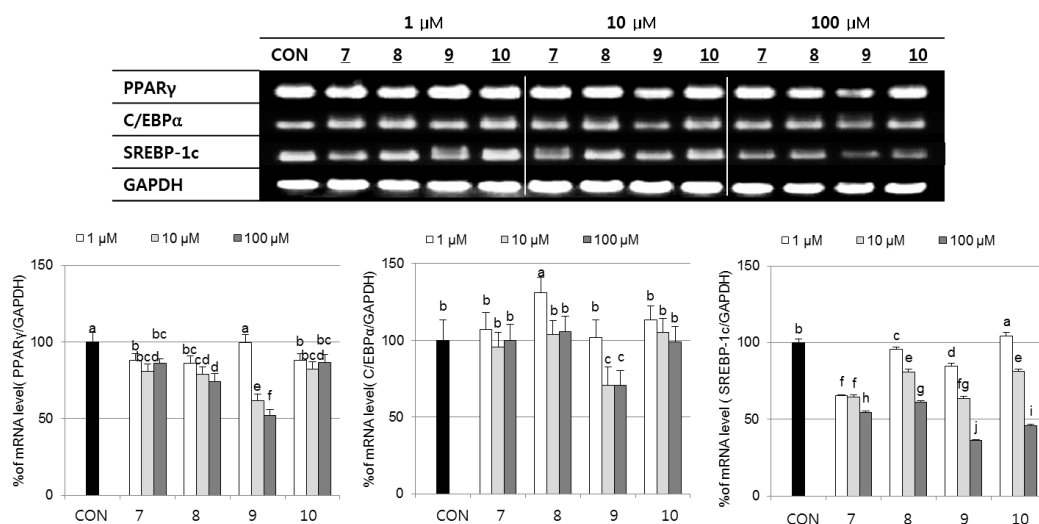


Figure 29. Effect of compounds 7-10 from *Portulaca oleracea* on adipogenic transcriptional factors in 3T3-L1 adipocytes. ^{a-j}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test. CON: fully differentiated control adipocytes (0.5 mM methylisobutylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, and 5 μ g/ml insulin)

3.4.3.5.2. 표적 유전자 발현

지방세포로의 분화시 주요 전사인자들의 표적이 되는 5 가지 유전자 FATP1, FAS, FABP4, LPL, ACS1 의 발현을 검토하였으며, 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 나타내었다.

Figure 30 은 FATP-4, FABP-1, ACS1 유전자 발현을 나타낸 것이다. FAPT4 에서 처리한 모든 화합물이 대조군에 비교하여 발현을 억제시킴을 확인하였으며, 그 중 compounds 9 과 10 는 100, 50 μ M 농도에서 40%이상 발현을 억제하는 효과를 보였다. FABP-1 의 경우, 대조군과 비교시 모든 화합물에서 유전자의 발현을 억제하였으며, 그 중 compounds 8, 9, 10 는 100 μ M 에서 60%이상 감소시키는 결과를 나타내었다. 50 μ M 농도에서도 compounds 9 과 10 번은 40%이상 FABP-1 의 발현을 감소시켰다. FATP-4 와 FABP-1 은 fatty acid 의 지방대사에서 중요한 역할을 하는 표적유전자로서 세포 내로 혈중 fatty acid 의 유입을 촉진시킨다(Salas et al 2007). Compound 9 과 10 는 FATP-4 와 FABP-1 의 발현을 감소시킴으로서 세포내 fatty acid 의 대사를 감소시켜 adipogenesis 를 억제하는 것으로 사료된다.

ACS1 은 세포내에서 acyl CoA 을 합성하여 fatty acid 를 합성하는 효소로서 compound 9 에 의해서 효과적으로 발현이 억제됨을 확인하였다. 100 μ M 의 농도에서는 50% 가량 발현이 억제되었으며, 50 μ M 에서도 25% 감소되는 것이 확인되었다.

Figure 31 에 나타난 FAS 유전자는 malonyl CoA 로부터 지방산을 합성하는 효소로서, 100 μ M 에서 compounds 9 과 10 만이 20% 이상 억제하는 것으로 나타났다.

LPL 은 혈중에 존재하는 TG 를 지방세포로 유입되기 좋은 형태의 유리 지방산으로 분해하여 지방세포에서 TG 축적을 도와준다(Yamaguchi et al. 2002). Figure 31 에서 보듯이 100 μ M 의 농도에서 compound 9 과 10 는 70%

이상 LPL 유전자 발현을 억제하는 것으로 나타났으며, 50 μ M 농도에서는 20% 이상의 효과를 나타냈다. 또한 compound 8 는 100 μ M 농도에서 30% 이상 억제하는 것으로 나타났다(Bullo et al. 2002).



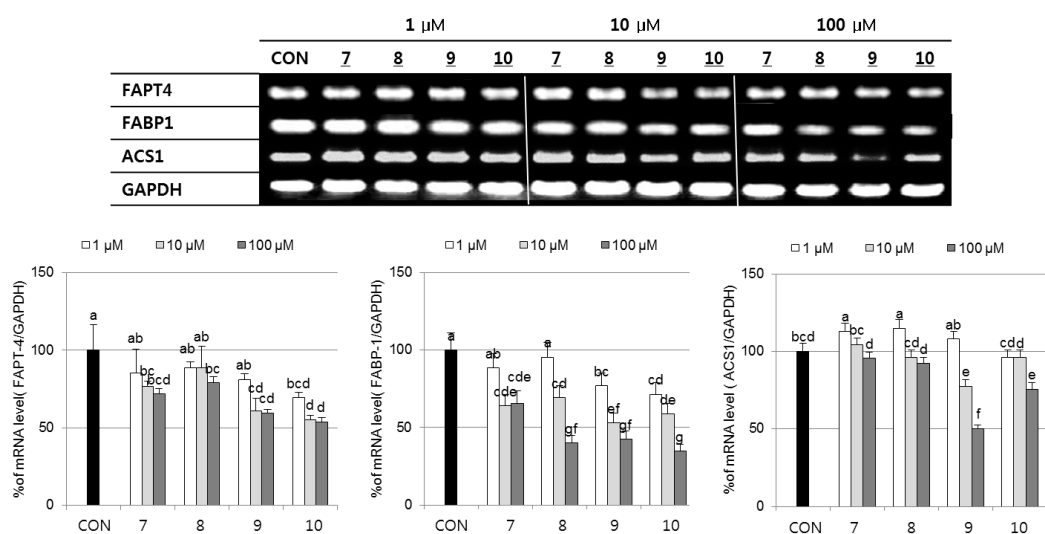


Figure 30. Effect of compounds 7-10 from *Portulaca oleracea* on adipogenic target gene expression in 3T3-L1 adipocytes. ^{a-g}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test. CON: fully differentiated control adipocytes (0.5 mM methylisobutylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, and 5 μ g/ml insulin)

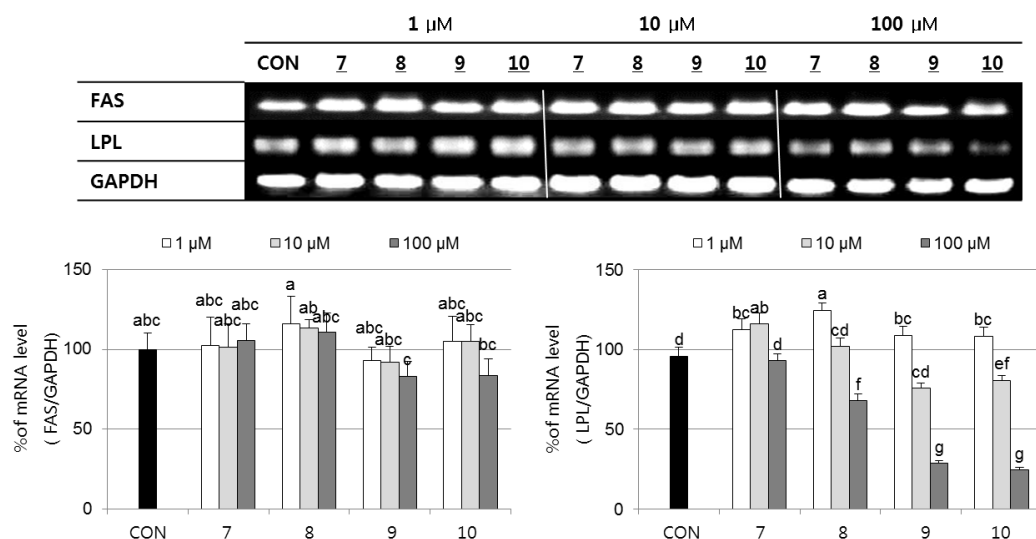


Figure 31. Effects of compounds 7-10 from *Portulaca oleracea* on adipogenic target gene expression in 3T3-L1 adipocytes. ^{a-g}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test. CON: fully differentiated control adipocytes (0.5 mM methylisobutylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, and 5 μ g/ml insulin)

3.4.3.5.3. Adipocytokine 유전자 발현

지방세포는 에너지 대사를 비롯한 체내 여러가지 항상성을 유지시켜주는 기능을 수행하고 다양한 신호전달물질을 분비한다. 대표적으로 leptin, TNF- α , resistin, adiponectin 등이 알려져 있으며, 본 연구에서는 leptin 과 TNF- α 에 의한 유전자 발현을 검색하였다.

Leptin 은 지방세포에서 주로 분비되며 식욕을 억제하고 에너지 소비를 유도하여 에너지 항상성을 유지하는 역할을 한다. 하지만 leptin 의 혈중 농도가 높은 것은 지방의 축적을 또한 높은 것을 의미하므로 과도한 leptin 의 농도는 비만을 유발할 수 있으며, 지방축적 정도를 측정할 수 있다. Figure 32 에서 볼 수 있듯이 compounds 9 과 10 는 100 μ M 농도에서 70% 이상 leptin 유전자의 발현을 억제하는 것으로 나타났으며, compound 8 의 경우, 30% 가량 유전자 발현을 억제하였다. 10 μ M 농도에서 compound 9 과 10 는 20% 이상 감소시켰다.

TNF- α 는 지방세포에서 주로분비되는 cytokine 으로 인슐린 저항성을 유도하여 비만과 같은 질병을 유도한다. Figure 32 에서 사용된 모든 화합물이 100 μ M 에서 TNF- α 의 유전자 발현을 효과적으로 억제하였고, compounds 8, 9, 10 의 경우, 100 μ M 에서 60% 이상으로 발현을 억제하였다. 특히 compounds 9 과 10 은 10 μ M 의 농도에서도 50% 이상 감소시켰다.

Compounds 9 과 10 는 지방세포에서 발현되는 adipocytokine 인 leptin 과 TNF- α 를 효과적으로 감소시키는 것을 확인하였다.

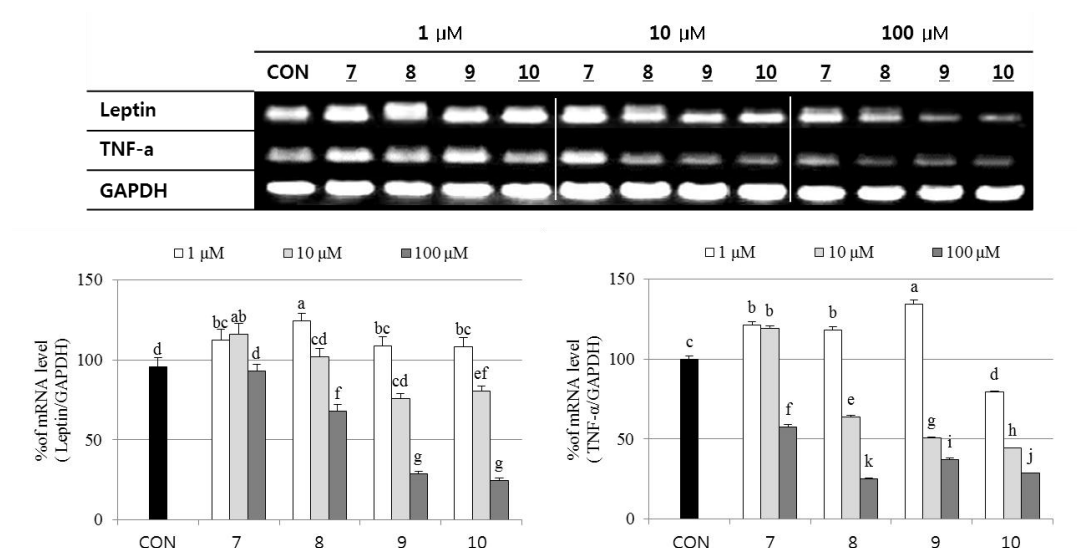
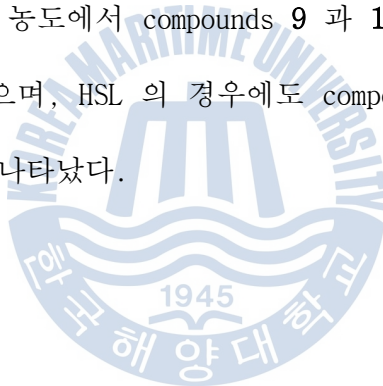


Figure 32. Effects of compounds **7–10** from *Portulaca oleracea* on adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes. ^{a–j}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test. CON: fully differentiated control adipocytes (0.5 mM methylisobutylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, and 5 μ g/ml insulin)

3.4.3.5.4. 지방분해 유전자 발현

지방세포내 TG droplet 는 세포질에 분포하는 지방분해 효소인 HSL로부터 보호되기 위하여 perilipin 에 의해 덮여 있다. HSL 과 perilipin 은 PKA 에 의해 인산화 되어 그들의 활성이 조절된다. 세포내 cAMP 의 농도가 증가하게 되면 PKA 가 활성화되어 HSL 과 perilipin 을 각각 인산화 시킨다. 인산화 된 perilipin 은 비활성되어 TG droplet 에서 떨어지게 되고 인산화된 HSL 은 TG droplet 으로 이동하여 TG 를 fatty acid 와 glycerol 로 분해한다(Kraemer et al, 2006). Figure 33 에서 보여진 것처럼 두 유전자의 발현을 확인한 결과, perilipin 은 100 μ M 의 농도에서 compounds 9 과 10 번이 각각 15%와 25%로 유전자 발현을 억제하였으며, HSL 의 경우에도 compounds 9 과 10 가 유전자 발현을 억제하는 것으로 나타났다.



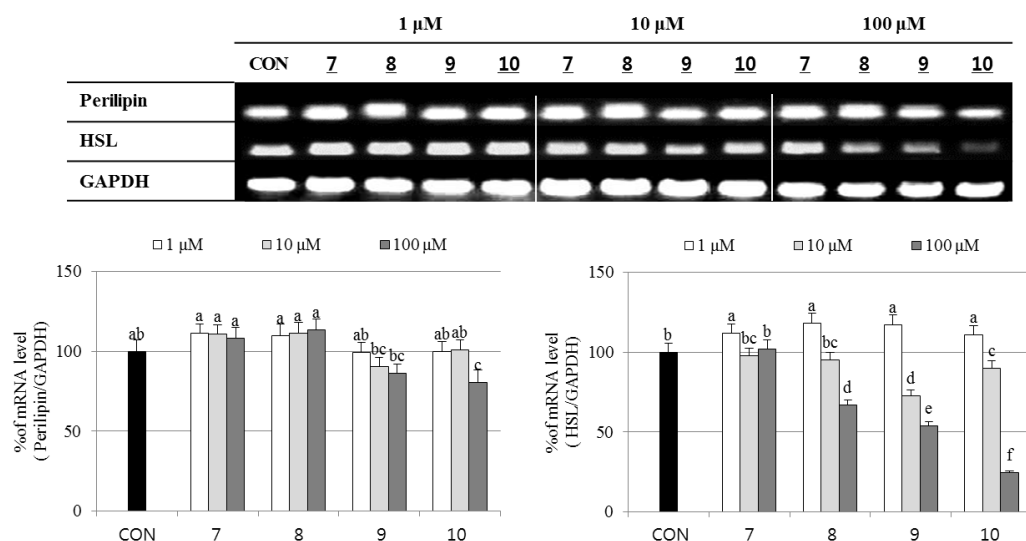


Figure 33. Effect of compounds 7-10 from *Portulaca oleracea* on lipolysis response gene expression in 3T3-L1 adipocytes. ^{a-f}Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple-range test. CON: fully differentiated control adipocytes (0.5 mM methylisobutylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, and 5 μ g/ml insulin)

4. 결 론

과학의 발달로 인하여 인간의 수명이 늘어나고 삶의 질의 향상에 대한 욕구가 증가하게 되면서 단순히 인간의 수명연장에 의한 삶이 아닌 삶의 질 향상을 위하여 개인의 건강관리, 다이어트나 미용등에 대한 관심이 고조되고 있다. 이에 따라 화장품, 건강식품 등과 같은 기능성 제품들에 대한 관심이 크게 증가하였으며, 현재 다양한 인공적인 제품들이 개발되어 판매되고 있지만 이러한 제품들에 대한 알러지 반응 등 새로운 부작용들이 생겨나게 되면서 친환경적 소재로부터의 기능성 제품 개발에 대한 관심이 집중되고 있다. 이러한 일환으로 천연물로부터 기능성 화장품 및 식품, 건강 보조식품 등의 개발이 새로운 사업으로 떠오르고 있다.

다양한 기능성 제품 개발을 위한 일환으로 우리나라에서 접근하기 쉽고 구입하기가 용이한 갈조류인 파배기 모자반과 전국일대에 자생하는 쇠비름으로부터 생리활성 물질을 찾고자 하였다. 먼저 제주도 해역에서 채집한 파배기 모자반을 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}$ (1:1)와 MeOH 의 용매로 각각 추출하여 두개의 조추출물을 얻어, 이를 혼합한 후에 극성순서에 따라 4 개의 용매분획인 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH 그리고 H_2O fraction 을 각각 얻었으며, 85% aq, MeOH 층으로부터 chromanol 계열의 화합물 3 종을 분리하였으며, 이들의 화학구조는 2D NMR 실험을 통하여 12-(3,4-dihydro-6-hydroxy-2,8-dimethyl-2H-1-benzopyran-2-yl)-2,5,9-trimethyl-dodeca-(5*E*,9*E*)-2,5,9-trien-4-one (1), 13-(3,4-dihydro-6-hydroxy-2,8-dimethyl-2H-1-benzopyran-2-yl)-5-hydroxy-2,6,10-trimethyl-trideca-(10*E*)-2,10-dien-4-one (2), 13-(3,4-

dihydro-6-hydroxy-2,8-dimethyl-2H-1-benzopyran-2-yl)-5-hydroxy-2,6,10-trimethyl-trideca-10*E*-en-4-one (3)으로 최종 결정하였으며, 모두 지금까지 보고 되지않은 신규 화합물들이다. 분리한 3 개의 화합물에 대한 DPPH radical 과 Peroxynitrite 소거 활성을 검색한 결과, 모든 화합물이 효과적으로 radical 을 소거하는 것으로 나타났다. 세포내 항산화 활성을 검색한 결과, 세포 내 생성된 ROS 를 효과적으로 소거하였으며, 지질과산화물을 억제하는 것으로 나타났다. 그 중 compound 2 가 가장 높은 활성을 나타내었으며, 이는 세포내 GSH 함량 또한 증가시키는 것으로 나타났다. 이들에 대한 인체유래 암세포 4 종(HT1080, HT-29, AGS, MCF-7)에 대한 세포증식 억제효과를 검색한 결과, 3 종의 화합물 모두 4 개의 암세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났으며, 그 중에서 compound 1 이 가장 높은 세포 증식 억제 효과를 나타내었다.

전국 각지에서 구입한 쇠비름은 CH_2Cl_2 와 MeOH 용매로 각각 추출하였으며, 파배기모자반의 분획과 동일한 방법으로 4 개의 용매분획층으로 나누었다. 용매 분획층에 대한 암세포 증식 억제효과를 검색한 결과, 85% aq.MeOH 층이 4 종의 암세포의 성장을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났으며, 이와 함께 HT1080 세포를 이용한 세포침윤 억제 효과에 대한 활성을 검색한 결과 에서도 MMP-9 의 발현을 유의적으로 억제하였다. *n*-Hexane 층 또한 HT-1080 세포를 제외한 대부분의 분획층에서 세포증식 억제 효과를 보였으며, MMP-9 또한 감소시키는 것으로 나타났다. 따라서 85% aq.MeOH 층으로부터 6 개의 새로운 homosoflavonoids 화합물들(7-12)을 분리하였으며, 각 화합물의 구조는

NMR 데이터와 IR, UV, Mass 스펙트럼 분석을 통해서 5-hydroxy-7-methoxy-3-(2'-hydroxybenzyl)-4-chromanone (7), 5,7-dimethoxy-3-(2'-hydroxybenzyl)-4-chromanone (8), 5-hydroxy-6,7-dimethoxy-3-(2'-hydroxybenzyl)-4-chromanone (9), 5,6,7-trimethoxy-3-(2'-hydroxybenzyl)-4-chromanone (10), 5,9-dihydroxy-7-methoxy-3-(2'-hydroxybenzyl)-4-chromanone (11), (*E*)-5-hydroxy-7-methoxy-3-(2'-hydroxybenzyl)-4-chromanone (12)로 결정하였다. 이외에 homoisoflavonoid의 전구체인 2,2'-dihydroxy-4',6'-dimethoxychalcone (13)가 분리되어 그 구조결정이 이루어 졌다. 분리된 6종의 homoisoflavonoids 화합물 모두가 세포내에 생성된 ROS를 효과적으로 소거하였으며, 암세포에 대한 세포 증식 억제효과는 compound 10에 의해서만 효과적으로 나타났다. 쇠비름으로부터 분리된 compounds 7-10에 대한 항비만 효과도 검토되었다. 그 결과, compounds 9과 10는 지방구 형성을 억제하고 glucose의 함량을 증가시키며 glycerol 분비량을 증가시킴으로서 지질 축적을 억제하는 것으로 나타났다. 이와 관련하여 지방세포로의 분화를 조절하는 핵심 전사 인자인 PPAR γ , C/EBP α , SREBP1c의 발현을 감소시켜 지방세포로의 분화를 억제한다는 것이 관측되었으며 또한 그들의 표적 유전자인 FABP1, FATP4, LPL, FAS, ACS1의 발현을 억제하고 또한 지방세포에서 생성되는 leptin과 TNF- α 등의 adipocytokine의 발현을 억제함으로써 세포내 지질 축적을 억제하는 것으로 확인되었다. 이 뿐만 아니라 지방분해와 관련된 유전자인 perilipin도 감소시킴으로서 분리한 화합물들이 지방 축적과 분해 모두에 관련되어 있음이 확인되었다.

지금까지 분리된 homoisoflavonoid 계열의 물질들은 향균, 항염증, 항산화 등 다양한 생리활성을 가지는 것으로 보고 되고 있다. Homoisoflavonoid 의 화학구조는 비교적 간단하기 때문에 합성을 통하여 대량확보하는 것이 어느 정도 가능하다고 할 수 있다. 본 연구에서도 B ring 에 2-methoxy group 이 포함되는 3-(2-methoxybenzyl)-4-chromanone 을 효과적으로 합성하였다. 추후, 이렇게 합성된 화합물들에 대한 다양한 생리활성 검색을 통하여 새로운 선도물질을 창출할 수 있을 것으로 예상된다.



참고문헌

- Adachi T., Nakatsukasa M. (1983) High-performance liquid chromatographic separation of betalains and their distribution in *Portulaca grandiflora* and related species. *Z. Pflanzenphysiol* **109**, 155-162.
- Adinolfi M., Barone G., Belardini M., Lanzetta R., Laonigro G., Parrilli M. (1984) 3-Benzyl-4-chromanones from *Muscari comosum*. *Phytochemistry* **23**, 2091-2093.
- Adinolfi M., Barone G., Belardini M., Lanzetta R., Laonigro G., Parrilli M. (1985) *Phytochemistry* **24**, 2423.
- Adinolfi M., Barone G., Corsaro M., Mangoni L. (1988) Absolute configuration of homoisoflavanones from *Muscari species*. *Tetrahedron* **44**, 4981-4988.
- Adinolfi M., Barone G., Lanzetta R., Laonigro G., Mangoni L., Parrilli M. (1985) The 3-benzyl-4-chromanones from *Muscari comosum*. *Phytochemistry* **24**, 624-626.
- Adinolfi M., Corsaro M. M., Lanzetta R., Laonigro G., Mangoni L., Parrilli M. (1987) Ten homoisoflavanones from two *Muscari species*. *Phytochemistry* **26**, 285-290.
- Adinolfi M., Lanzetta R., Laonigro G., Parrilli M., Breitmaier E. (1986) ^1H and ^{13}C chemical shift assignments of homoisoflavanones, *Magn. Reson. Chem.* **24**, 663-666.

- Amschler G., Frahm A. W., Hatzelmann A., Kilian U., Muller-Doblis, D.,
Muller-Doblis U. (1996) Constituents from *Veltheimia viridifolia* I.
Homoisoflavones of the bulbs. *Planta Medica* **62**, 534-539.
- Anh N. T. H., Sung T. V., Porzel A., Franke K., Wessjohann, L. A. (2003)
Homoisoflavonoids from *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler.
Phytochemistry **62**, 1153-1158.
- Asano T., Murayama T., Hirai Y., Shoji J. (1993) Comparative studies on
the constituents of *Ophiopogonis tuber* and its congeners. VII.
Studies on the homoisoflavonoids of the subterranean part of
Ophiopogon japonicus Ker-Gawler cv. Nanus. *Chem. Pharm. Bull.* **41**,
391-393.
- Awad N. E. (1994) Lipid content and antimicrobial activity of phenolic
constituents of cultivated *Portulaca oleracea* L. *Bull. Fac. Pharm.*
Cairo Univ. **32**, 137-142.
- Bae J. H. (1999) Effect of *Portulaca oleracea* extract on removing
nicotine component of tobacco. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**,
607-612.
- Bangani V., Crouch N. R., Mulholland D. A. (1999) Homoisoavanones and
stilbenoids from *Scilla nervosa*. *Phytochemistry* **51** 947-951.

- Bohler P., Tamm C. (1967) The homo-isoflavones, a new class of natural product. Isolation and structure of eucomin and eucomol. *Tetrahedron Letters*. **3479**
- Broadbent D., Mabelis R. P., Spencer H. (1975) 3,6,8-Trihydroxy-1-methylxanthone: an antibacterial metabolite from *Penicillium patulum*. *Phytochemistry* **4**, 2082-2083.
- Brown M.S., Goldstein J. L. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **899**, 331-340.
- Calvo M. I. (2009) Three new homoisoflavanones from the bulbs of *Ledebouria floribunda*. *Fitoterapia* **80**, 394-398.
- Camarda L., Merlini L., Nasini G. (1983) Dragon's blood from *Dracaena draco*, structure of novel homoisoflavanoids. *Heterocycles* **20**, 39-43.
- Campfield L. A., Smith F. J., Guisez Y., Devos R., Burn P. (1995) Recombinant mouse OB protein : evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, **269**, 546-549.
- Chang J. M., Shen C. C., Huang Y. L., Chien M. Y., Ou J. C., Shieh B. J., Chen C. C. (2002) Five new homoisoflavanoids from the tuber of *Ophiopogon japonicus*. *J. Nat. Prod.* **65**, 1731-1733.

- Chatterjea J. N., Shaw P. K., LAL P. K., Singh R. P. (1979) Homoisoflavones Part-IV. Futer synthetical experiments, *J. Indian Chem. Soc.* LVI, 1006-1009.
- Choi B. R., Hong S. S., Han X. H., Hwang J. S., Lee M. H., Hur J. D., Hwang B. Y., Ro J. S. (2005) Antioxidant constituents from *Portulaca oleracea*. *Natural Product Sciences* **11**, 229-232.
- Crouch N. R., Bangani V., Mulholland D. A. (1999) Homoisoflavanones from three South African *Scilla* species. *Phytochemistry* **51**, 943-946.
- Desideri N., Oliveri S., Stein M. L., Sgro R., Orsi N, Conti C. (1997) Synthesis and anti-picornavirus activity of homo-isoflavonoids. *Antiviral Chem. Chemother.* **8**, 545-555.
- Donnell G. O. Bucar F., Gibbons S. (2006) Phytochemistry and antimycobacterial activity of *Chlorophytum inornatum*. *Phytochemistry* **67**, 178-182.
- El-Sayed M.-I K. (2011) Effects of *Portulaca oleracea* L. seeds in treatment of type-2 diabetes mellitus patients as adjunctive and alternative therapy. *Journal of Ethnopharmacology* **137**, 643-651.
- Elkhayat E. S., Ibrahim S. R., Aziz M. A. (2008) A new diterpene from *Portulaca oleracea* L. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **10**, 1039-1043.

- Farkas L., Gottsegen A., Nogradi M. (1970) The synthesis of eucomin and (\pm)-eucomol. *Tetrahedron* **26**, 2787-2790.
- Farkas L., Gottsegen A., Nogradi M., Sterelisky J. (1971) Synthesis of jomoisoflavanones-II. Constituents of *Eucomis autumnalis* and *E. punctata*. *Tetrahedron* **27**, 5049-5054.
- Finckh R. E., Tamm C. (1970) The homoisoflavones III. Isolation and structure of punctatin, 3,9-dihydropunctatin, 4'-O-methyl-3,9-dihydropunctatin, 4'-demethyleucomin and 4'-demethyl-5-O-methyl-3,9-dihydro-eucomin. *Experientia* **26**, 472-473.
- Habtemariam S., Harvey A. L., Waterman P. G. (1993) The muscle relaxant properties of *Portulaca oleracea* are associated with high concentrations of potassium ions. *J. Ethnopharmacol* **40**, 195-200.
- Habtemariam S., Harvey A. L., Waterman P. G. (1993) The muscle relaxant properties of *Portulaca oleracea* are associated with high concentrations of potassium ions. *J. Ethnopharmacology* **40**, 195-200.
- Heller W., Andermatt P., Schaad W. A., Tamm C. (1976) Homoisoflavanone. IV. Neue inhaltsstoffe der eucomin-reihe von *Eucomis bicolor*. *Helvetica Chimica Acta* **59**, 2048-2058.
- Heller W., Tamm C. (1981) A review on homoisoflavanones and biogenetically related compounds. *Fortsehr. Chem. Org. Naturst.* **40**, 105-152.

- Heller W., Tamm C. (1981) Homoisoflavanones and biogenetically related compounds. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* **40**, 105-152.
- Heo S. J., Kim J. P., Jung W. K., Lee N. H., Kang H. S., Jun E. M., Park S. H., Kang S. M., Lee Y. J., Park P. J., Jeon Y. J. (2008) Identification of chemical structure and free radical scavenging activity of diploretohydroxycarmalol isolated from brown alga, *Ishige okamurae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 676-681.
- Huang P. L., Gan K. H., Wu R. R., Lin C. N. (1997) Benzoquinones, a homoisoflavanone and other constituents from *Polygonatum altelobatum*, *Phytochemistry* **44**, 1369-1373.
- Kang H., Chung H., Jung J., Son B., Choi J. (2003) A new phlorotannin from the Brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Chem. Pharm. Bull.* **51**(8), 1012-1014.
- Imperato F. (1975) Acylated betacyanins of *Portulaca oleracea*. *Phytochemistry* **14**, 2091-2092.
- Jain A. C., Khazanchi R. J. (1978) *scient ind. Res.* **37**, 408.
- Jang K. H., Lee B. H., Choi B. W., Lee H. Shin J. (2005) Chromenes from the Brown Alga *Sargassum siliquastrum*. *J. Nat. Prod.* **68**(5), 716-723.
- Jessop J. P. (1972) Studies in the bulbous *Liliaceae* in South Africa: 2. *Drimiopsis* and *Resnova*. *Journal of South African Botany* **38**, 151-162.

- Kang, M. C., Lee J. Y., Ko R. K., Kim H. B., Hong S. H., Kim G. O. (2008) Melanin inhibitory effect and anti-inflammatory effects of *Dietyota coriacea* extracts derived from adjacent sea of the Jeju island. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**, 311-316.
- Kang, S. Y., Oh M. J., Shin J. A. (2005). Antimicrobial activity of Korean marine algae against fish pathogenic bacteria. *J. Fish Pathol.* **18**, 147-156.
- Kim J.B., Wright H.M., Wright M., Spiegelman B. M. (1999) ADD1/SREBP1 activates PPAR through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4333-4337.
- Kim, S. A., Kim J., Woo M. K., Kwak C. S., Lee M. S. (2005) Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 451-459.
- Kirkiacharia B. S., Gomis M., Tongo H. G., Mahuteau J., Brion J. D. (1984) The ^{13}C NMR spectra of homoisoflavonoids. *Org. Magn. Reson* **22**, 106-108.
- Kirkiacharian B. S., Tongo H. G., Bastide J., Bastide P., Grenie M. M. (1989) Synthese et activite's angioprotectrice, anti-allergique et antihistaminique de benzyl-3 chromones (homo-isoflavones). *Eur. J. Med. Chem.* **24**, 541-546.

- Koch K., Biggers M. S. (1994) General preparation of 7-substituted 4-chromanones: synthesis of a potent aldose reductase inhibitor. *J. Org. Chem.* **59**, 1216-1218.
- Kong, C. S., Um Y. R., Lee J. I., Kim Y. A., Lee J. S., Seo Y. W. (2008) Inhibition effects of extracts and its solvent fractions isolated from *Limonium tetragonum* on growth of human cancer cells. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**, 177-182.
- Koo, J. G., Y. S. Choi, and J. K. Kwak. 2001. Blood-anticoagulation activity of fucoidans from sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Laminaria religiosa*, *Hizikia fusiforme*, and *Sargassum fulvellum* in Korea. *J. Korean Fish Soc.* **34**, 515-520.
- Koorbanally C., Crouch N. R., Langlois A., Mulholland D. A. (2006) The phytochemistry and ethnobotany of the southern African genus *Eucomis* (*Hyacinthaceae: hyacinthoideae*). *Phytochemistry Advances in research*, 69-85.
- Koorbanally C., Crouch N. R., Langlois A., Toit D. K., Mulholland D. A., Drewes S. E. (2006) Homoisoflavanones and spirocyclic nortriterpenoids from three *Eucomis* species: *E. comosa*, *E. schijffii* and *E. pallidiflora* subsp. *pole-evansii* (*Hyacinthaceae*). *South African Journal of Botany* **72**, 428-433.
- Koorbanally N. A., Crouch N. R., Harilal A., Pillay B., Mulholland D. A. (2006) Coincident isolation of a novel homoisoflavonoid from *Resnova*

- humifusa* and *Eucomis Montana*. (*Hyacinthoideae: Hyacinthaceae*).
Biochemical Systematics and Ecology **34**, 114-118.
- Kraemer F. B., and W.-J. Shen (2006) Hormone-Sensitive Lipase Knockouts
Fredric B Kraemer and Wen-Jun Shen Nutrition & Metabolism* 2006, **3**,:
 121-127.
- Kuomo I., Komori T., Kawasaki T. (1973) Zur struktur der neuen typen
 homo-isoflavanone aus bulben von *scilla scilloides* druce.
Tetrahedron Letters **14**, 4569-4572.
- Kwak, C. S., S. A. Kim, and M. S. Lee. (2005) The correlation of
 antioxidative effects of 5 Korean common edible seaweeds and total
 polyphenol content. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 1143-1150.
- Lee J. I., Seo Y (2011) Chromanols from *Sargassum siliquastrum* and their
 antioxidant activity in HT 1080 cells. *Chem. Pharm. Bull.* **59**(6),
 757-761.
- Lee M. S., Kim C. T., Kim C. J., Cho Y. J., Kim Y. (2006) Effects of
Portulaca Oleracea L. Extract on lipolysis and hormone sensitive
 lipase (HSL) Gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Korean J. Nutr.*
39, 742-747.
- Lee T. B. (1999) Illustrated Flora of Korea. *Hyangmunsa Publishing Co.*,
 Seoul, pp. 324,

- Li-hong L., Feng-Zhi R., shu-hong C., Yue-qi G. (2009) New homoisoflavanones from *Polygonatum odoratum* (Mill) Druce. *Acta. Pharm. Sin.* **44**, 764-767.
- Lim J. P., Suh E. S. (2000) Hepatoprotective, Diuretic and Anti-inflammatory Activities of the Extract form *Portulaca Oleracea* Linne. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **8**, 189.
- Lim M. K., Kim M. (2001) Antimicrobial activity of methanol extract from *soibirhym* (*Portulaca oleracea*) against food spoilage or foodborne disease microorganisms and the composition of the extract. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* **17**, 565-570.
- Liu L., Howe P., Zhou Y. F., Xu Z. Q., Hocart C., Zhan R. (2000) Fatty acids and beta-carotene in Australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties. *J. Chromatogr.* **893**, 207-213.
- López S. N., Sierra M. G., Gattuso S. J., Furlán R. L., Zacchino S. A. (2006) An unusual homoisoflavanone and a structurally-related dihydrochalcone from *Polygonum ferrugineum* (*Polygonaceae*). *Phytochemistry* **67**, 2152-2158.
- Mahapatra, T., Jana, N., & Nanda, S. (2008). Chemoenzymatic synthesis and resolution of compounds containing a quaternary stereocenters adjacent to a carbonyl group. *Tetrahedron: Asymmetry* **19**, 1224-1232.

Mašterov I., Suchý V., Uhrín D., Ubik K., Grančaiová Z., Bobovnický B.

(1991) Homoisoflavanones and other constituents from *Muscari racemosum*. *Phytochemistry* **30**, 713-714.

Mizutani M., Hashidoko Y., Tahara S. (1998) Factors responsible for inhibiting the motility of zoospores of the phytopathogenic fungus *Aphanomyces cochlioides* isolated from the non-host plant *Portulaca oleracea*. *FEBS Lett.* **438**. 236-240.

Mohamed A. I., Hussein A. S. (1994) Chemical composition of purslane (*Portulaca oleracea*). *Plant Foods Human Nutr.* **45**, 1-9.

Molinski T. F., Molinski, D. S. Dalisay, S. L. Lievens, and J. P. Saludes, (2009) Drug development from marine natural products, *Drug Discovery* 2009, **8**, 69-85.

Moodley N., Crouch N. R., Mulholland D. A., Slade D., Ferreira D. (2006) 3-Benzyl-4-chromanones (homoisoflavanones) from bulbs of the ethnomedicinal geophyte *Ledebouria revoluta* (*Hyacinthaceae*). *South African Journal of Botany* **72**, 517-520.

Nguyen A., Fontaine J., Malonne H., Duez P. (2006) Homoisoflavanones from *Disporopsis aspera*, *Phytochemistry* **67** 2159-2163.

- O'Donnell G., Bucar F., Gibbons S. (2006) Phytochemistry and antimycobacterial activity of *Chlorophytum inornatum* *Phytochemistry* **67**, 178-182.
- Omara-Alwala T. R., Mebrahtu T., Prior D. E., Ezekwe M. O. (1991) Omega three fatty acids. In purslane (*Portulaca oleracea*) tissues. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **68**, 198-199.
- Omara-Alwala T. R., Mebrahtu T., Prior D. E., Ezekwe M. O. (1991) Omega three fatty acids. In purslane (*Portulaca oleracea*) tissues. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **68**, 198-199.
- Parry O., Marks J. A., Okwuasaba F. K. (1993) The skeletal muscle relaxant action of *Portulaca oleracea*: role of potassium ions. *J. Ethnopharmacology* **40**, 187-194.
- Peng P. C., Haynes L. J., Magnus K. E. (1961) High concentration of (-)-Noradrenaline in *Portulaca oleracea* L. *Nature* **191**, 1108.
- Piattelli M., Minale L. (1964) Pigments of centrospermae-II, distribution of betacyanins, *Phytochemistry* **3**, 547-557.
- Qian Y., Liang J. Y., Qu W., Che Y. (2010) Two new homoisoflavanones from *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce. *Chinese Chemical Letters* **21**, 706-708.
- Quaglia M. G., Desideri N., Bossu E., Sgro R., Conti C. (1999) Enantioseparation and anti-picornavirus activity of 3-benzylchroman-

4-ones, *Chirality* **11**, 495-500.

Rasheed A. N., Afifi F. U., Shaedah M., Taha M. O. (2004) Investigation of the active constituents of *Portulaca oleraceae* L. (*Portulacaceae*) growing in Jordan. *Pak. J. Pharm. Sci.* **17**, 37-45.

Sakai N., Inada K., Okamoto M., Shizuri Y., Fukkuyama Y. (1996) Portuloside A, a monoterpene glucoside, from *Portulaca oleracea*. *Phytochemistry* **43**, 1625-1628.

Salas A., V. Noé V, C.J. Ciudad CJ, M. M. Romero MM, X. Remesar X, and M. Esteve M (2007) Short-term oleoyl-estrone treatment affects capacity to manage lipids in rat adipose tissue. *BMC Genomics* **8**, :292-299.

Scheuer P.J. Scheuer, ed.. (1978) Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives, Academic Press, New York, Vol. I – V.

Seo Y., Shin J., Cha H.J., Kim Y. A., Ahn J. W., Lee B. J., Lee D. S. (2003) A New Monoterpene Glucoside from *Portulaca oleracea*. *Bull. Korean Chem. Soc.* **24**, 1475-1477.

Seo Y., Shin J., Lee B. J., Lee D. S. (2003) Two biophenolic glycosides from *Portulaca oleracea*. *J. Korean Chem. Soc.* **47**, 43-46.

Shaikh M., Petzold K., Kruger H. G., Toit K. (2011) Synthesis and NMR elucidation of homoisoflavanone analogues. *Struct. Chem.* **22**, 161-166.

- Shepherd P. R., Kahn B. B. (1999) Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **341**, 248-257.
- Siddaiah V., Rao C. V., Venkateswarlu S., Krishnaraju A. V., Subbaraju G. V., (2006) Synthesis, stereochemical assignments, and biological activities of homoisoflavonoids. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 2545-2551.
- Sidwell W. T. L., Tamm C. (1970) The homo-isoflavanones II: isolation and structure of 4'-O-methylpunctatin A, autumnalin and 3, 9-dihydroautumnalin. *Tetrahedron Letters* **7**, 475.
- Silayoa A., Ngadjui B. T., Abegaz B. M. (1999) Homoisoflavonoids and stilbenes from the bulbs of *Scilla nervosa* subsp. *Rigidifolia*. *Phytochemistry* **52**, 947-955.
- Strack D., Vogt T., Schliemann W. (2003) Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* **62**, 247-269.
- Tada A., Kasai R., Saitoh T., Shoji J. (1980) Studies on the constituents of *Ophiopogonis* tuber. V. Isolation of a novel class of homoisoflavonoids and determination of their structures. *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 1477-1484.
- Tada A., Kasai R., Saitoh T., Shoji J. (1980) Studies on the constituents of *Ophiopogonis* tuber. VI. Structures of homoisoflavonoids. *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 2039-2044.

- Vastano B. C., Rafi M. M., DiPaola R. S., Zhu N., Ho C. T., Rella A. T., Ghai G., Rosen R. T. (2002) Bioactive homoisoflavanones from Vietnamese Coriander or Pak pai (*Polygonatum odoratum*). *ACS Symposium Series*. **803**, 269-280.
- Wall M. E., Wani M. C., Manikumar G., Taylor H., Mc Givney R. J. (1989) Plant antimutagenic agents, 5. Isolation and structure of two new isoflavones, fremontin and fremontone from *Psoralea fremontii*. *Nat. Prod.* **52**, 774-778.
- Watanabe Y., Sanada S., Ida Y., Shoji J. (1985) Comparative studies on the constituents of *Ophiopogon tuber* and its congeners. IV. Studies on the homoisoflavonoids of the subterranean part of *Ophiopogon ohwii* Okuyama and *O. jaburan* (Kunth) Lodd. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 5358-5363.
- Watson W.H., Jones D.P. (2003) Oxidation of Nuclear Thioredoxin during Oxidative Stress. *FEBS Lett.* **543**, 144-147.
- Weng Q., Yuan K., Zhang H., Xiong J., Wang C., Xu G. (2005) Determination of dopamine and norepinephrine in *Portulaca oleracea L.* by micellar electrokinetic capillary chromatography with amperometric detection. *Se Pu* **23**, 18-21.
- Xiang L., Xing D., Wang W., Wang R., Ding Y., Du L. (2005) Alkaloids from *Portulaca oleracea L.* *Phytochemistry* **66**, 2595-2601.

- Xin H. L., Hou Y. H., Xu Y. F., Yue X. Q., Li M., Lu J. C., Ling C. Q.
(2008) Portulacerebroside A: New cerebroside from *Portulaca oleracea* L. *Chinese Journal of Natural Medicines* **6**, 401-403.
- Xin H. L., Xu Y. F., Hou Y. H., Zhang Y. N., Yue X. Q., Lu J. C., Ling C. Q. (2008) Two novel triterpenoids from *Portulaca oleracea* L. *Helv. Chim. Acta.* **91**, 2075-2080.
- Xu X., Yu L., Chen G. (2006) Determination of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 493-499.
- Yang H., Zeng M., Dong S., Liu Z., LI R. (2010) 'Anti-proliferative activity of phlorotannin extracts from brown algae *Laminaria japonica* Aresch', *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **28**(1), 122-130
- Yang Z., Liu C., Xiang L., Zheng Y. (2009) Phenolic alkaloids as a new class of antioxidants in *Portulaca oleracea*. *Phytother. Res.* **23**, 1032-1035.
- Yook C. S. (1989) Coloured medicinal plants of Korea. *Academic Publishing Co.*, Seoul, pp 164.
- Zhang R., Lee H., Yoon Y., Kim S., Kim H., Li S. H., An S. (2009) The melanin inhibition, anti-aging and anti-inflammation effects of

Portulaca oleracea extracts on cells. *The Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology* **24**, 397-402.

Zhu Y., Yan K., Tu G. (1987) Two homoisoflavones from *Ophiopogon japonicus*. *Phytochemistry* **26**, 2873-2874.



부록

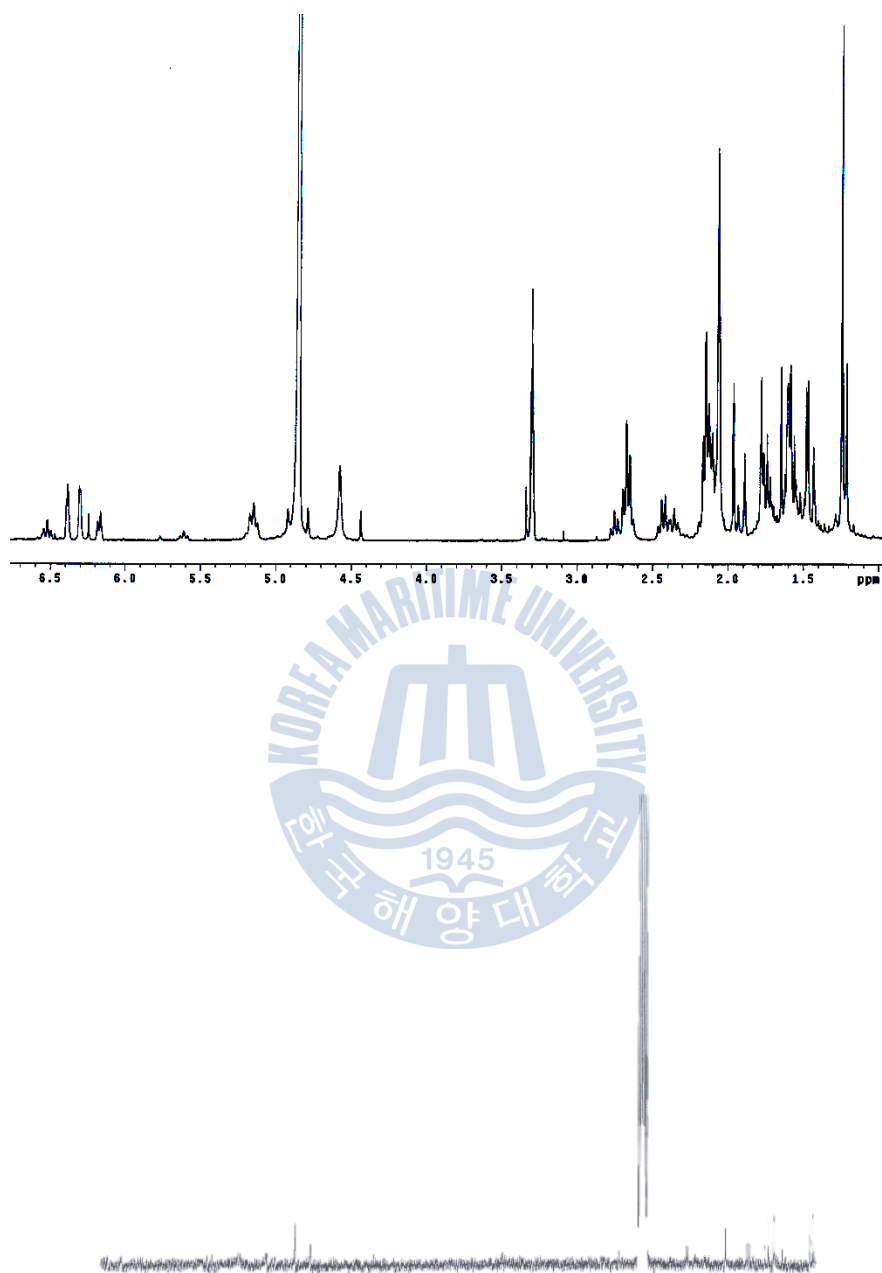


Figure 34. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound **1** isolated from *Sagassum siliquastrum* in CDCl_3 .

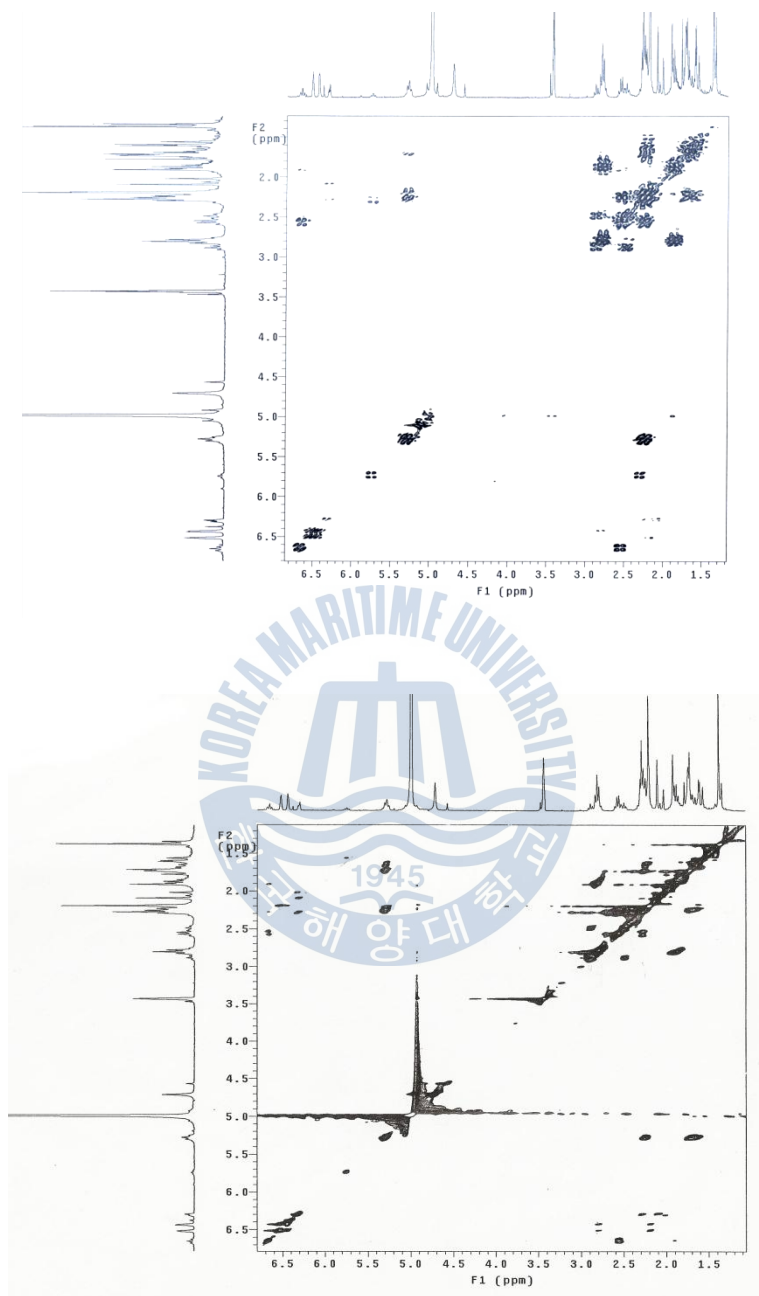


Figure 35. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound **1** isolated from *Sagassum siliquastrum* in CDCl₃.

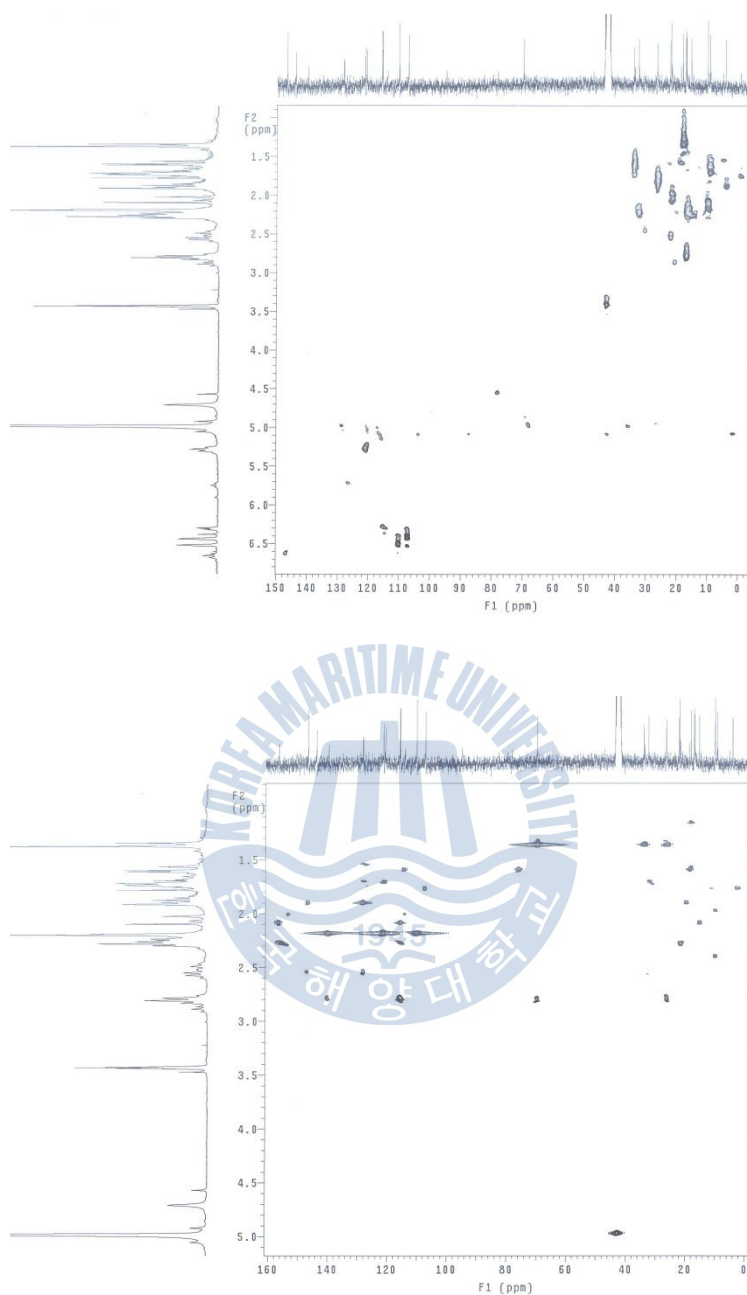


Figure 36. gHMQC and gHMBC spectrum of compound **1** isolated from *Sagassum siliquastrum* in CDCl₃.

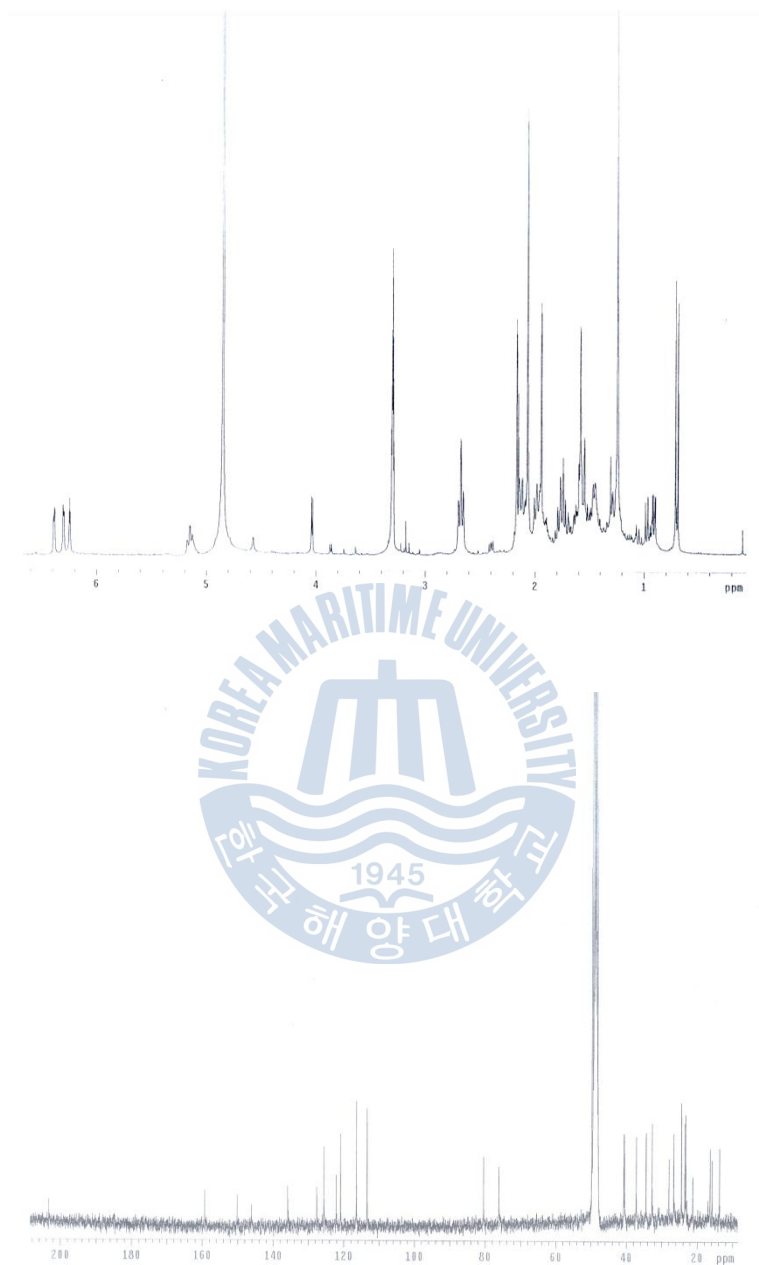


Figure 37. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound **2** isolated from *Sagassum siliquastrum* in CDCl_3 .

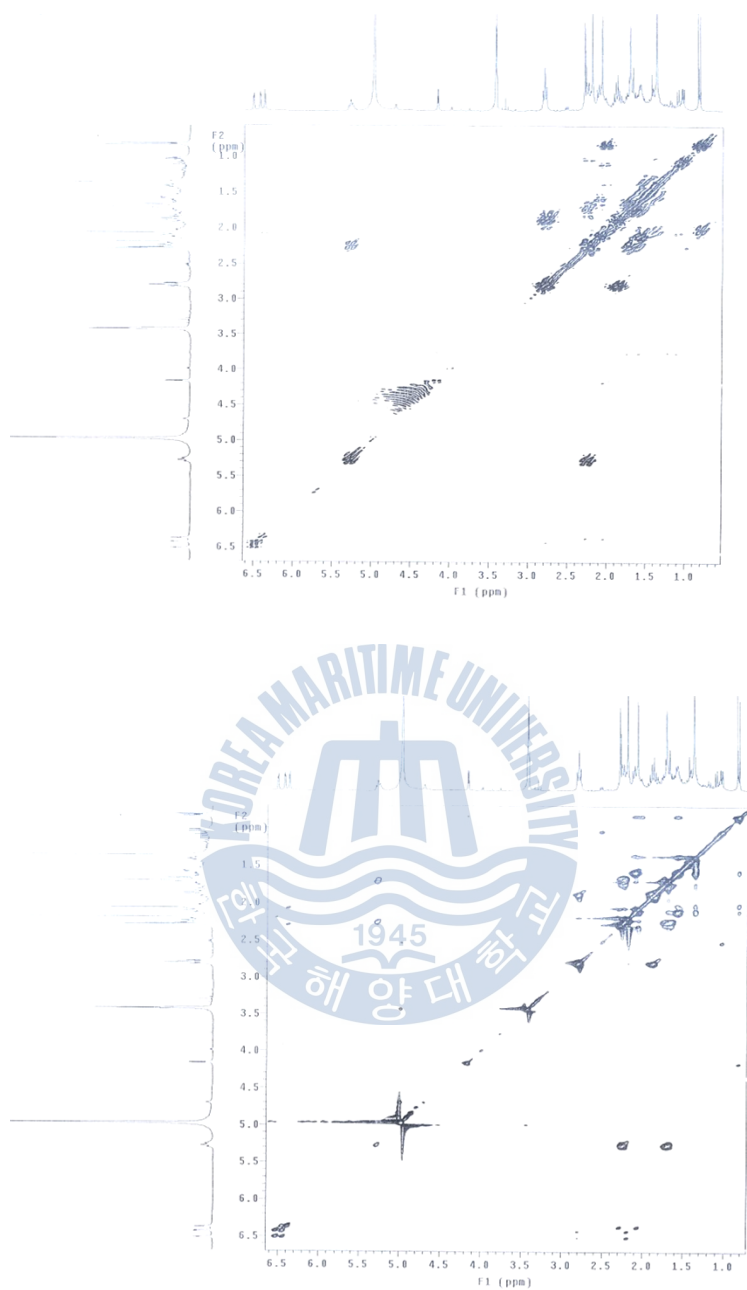


Figure 38. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound **2** isolated from *Sagassum siliquastrum* in CDCl_3 .

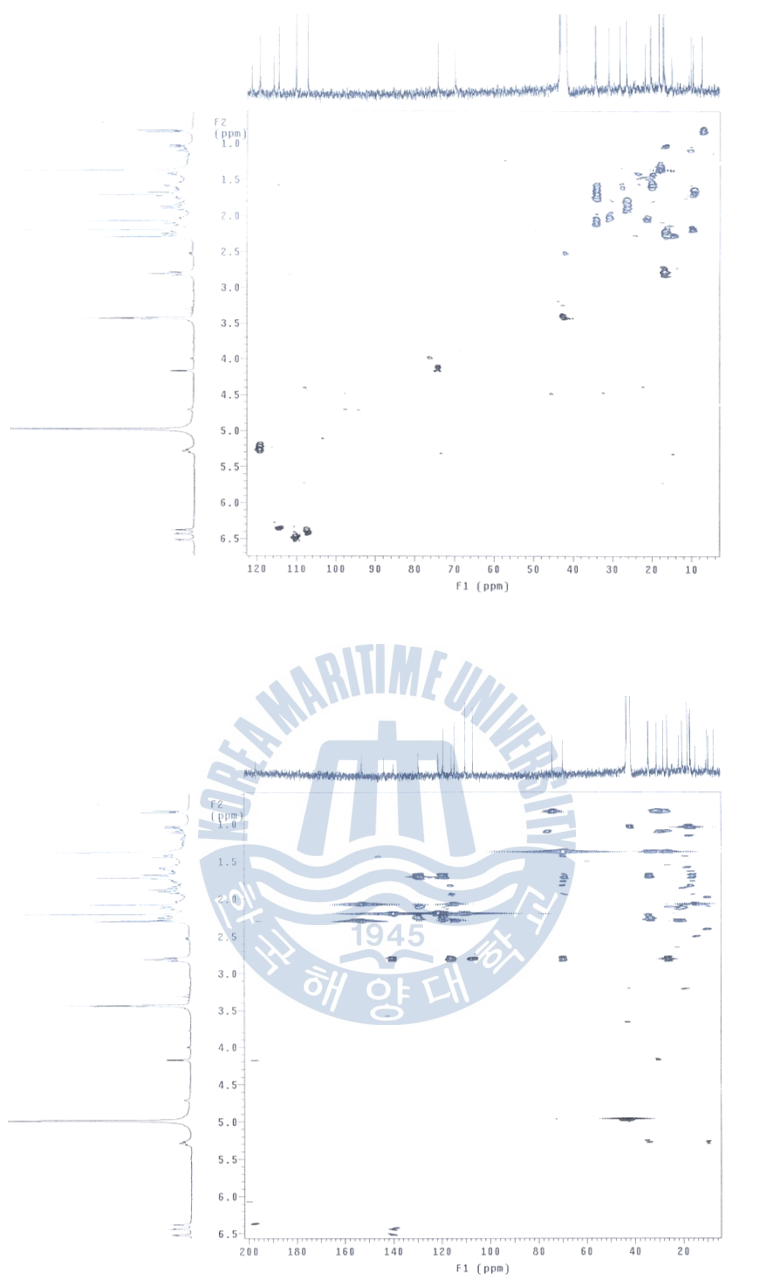


Figure 39. gHMQC and gHMBC spectrum of compound **2** isolated from *Sagassum siliquastrum* in CDCl₃.

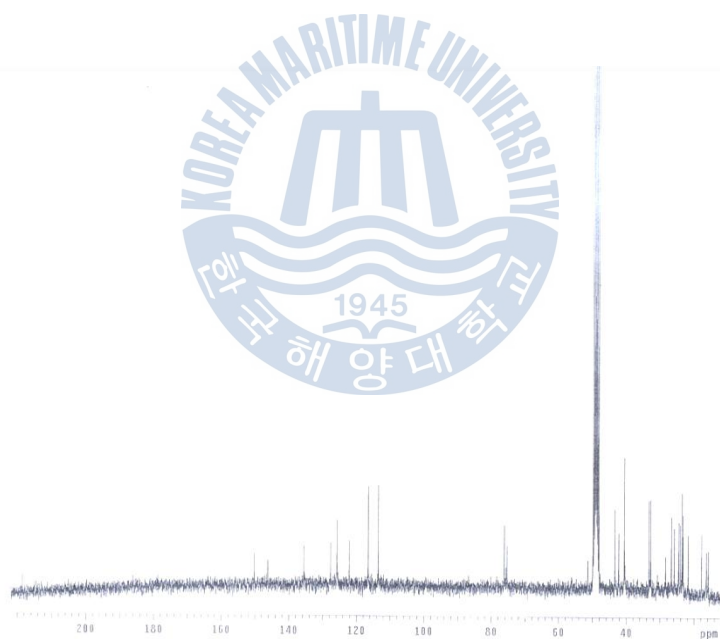
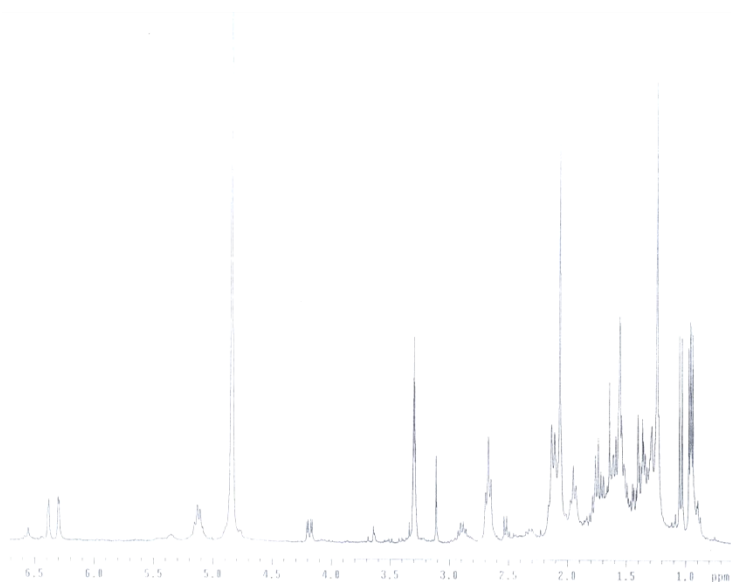


Figure 40. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound **3** isolated from *Sagassum siliquastrum* in CDCl_3 .

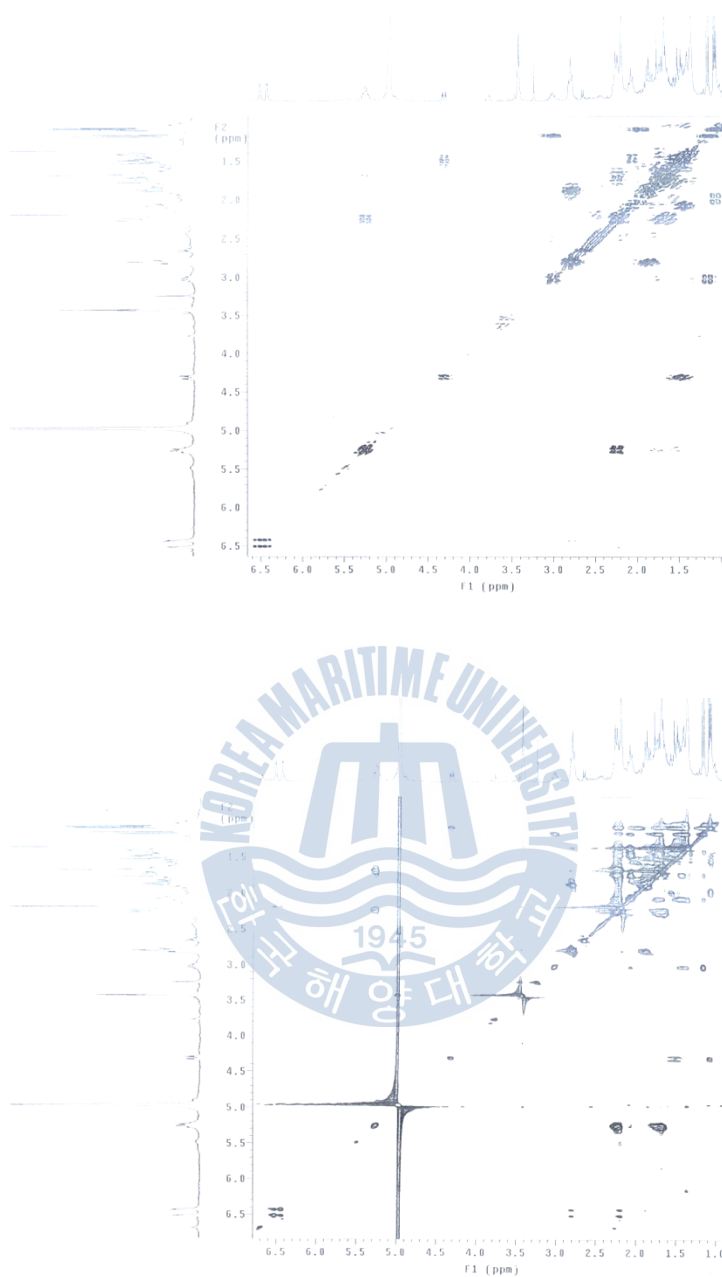


Figure 41. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound **3** isolated from *Sagassum siliquastrum* in CDCl₃.



Figure 42. gHMQC and gHMBC spectrum of compound **3** isolated from *Sagassum siliquastrum* in CDCl_3 .

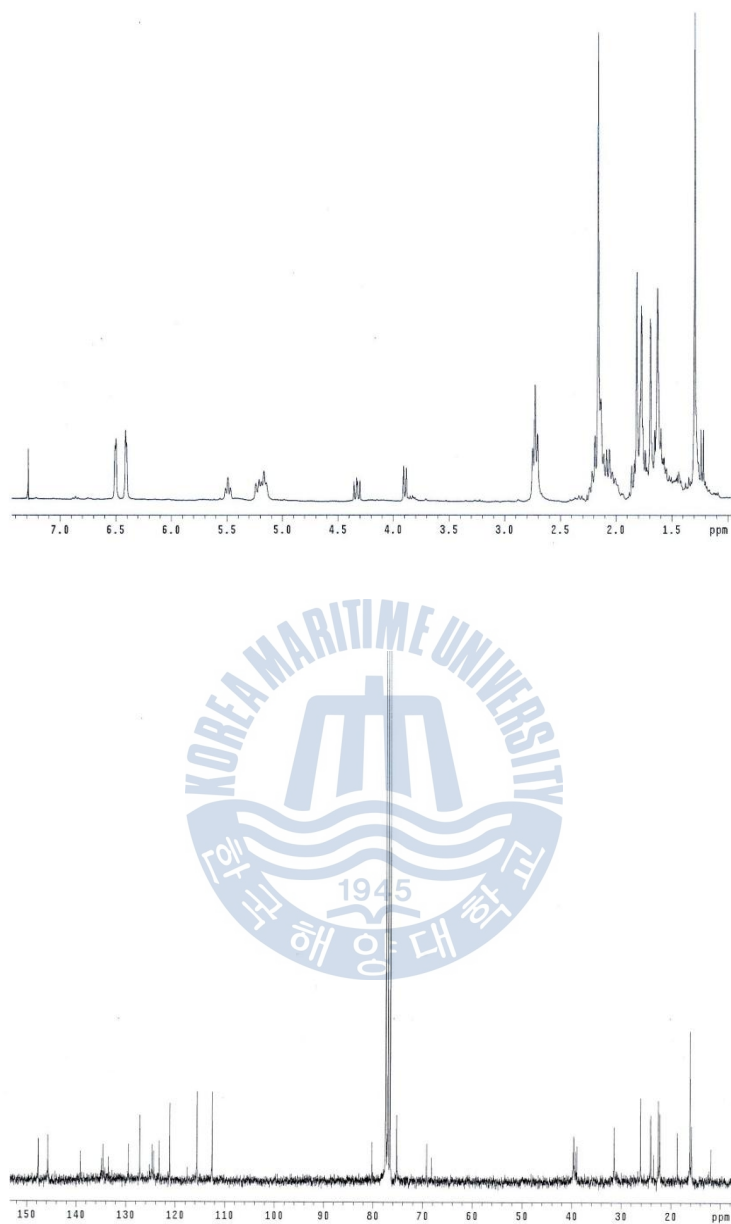


Figure 43. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound **4** isolated from *Sagassum siliquastrum* in CDCl_3 .

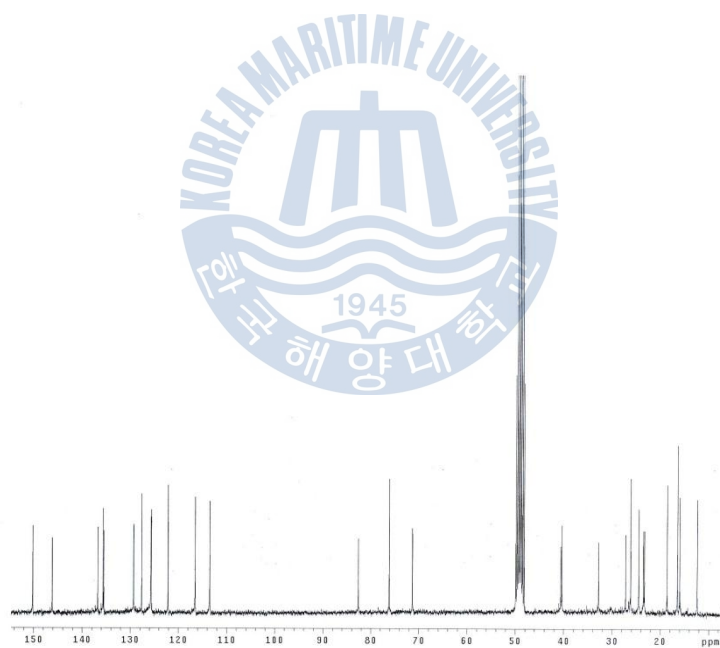
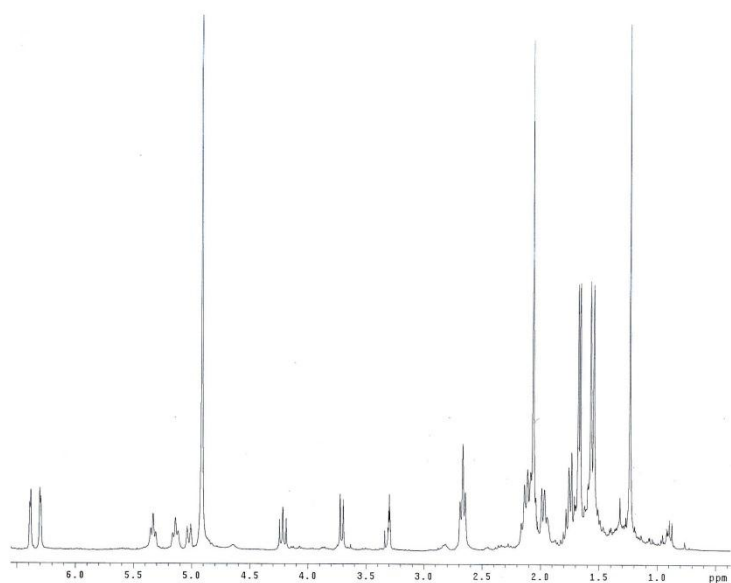


Figure 44. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound **5** isolated from *Sagassum siliquastrum* in CDCl_3 .



Figure 45. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound **6** isolated from *Sagassum siliquastrum* in CDCl_3 .

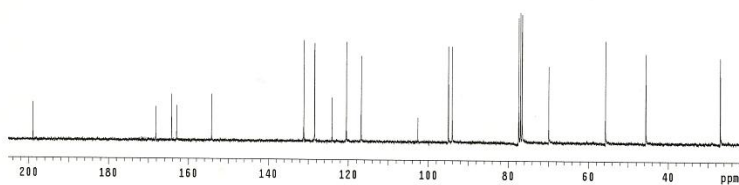
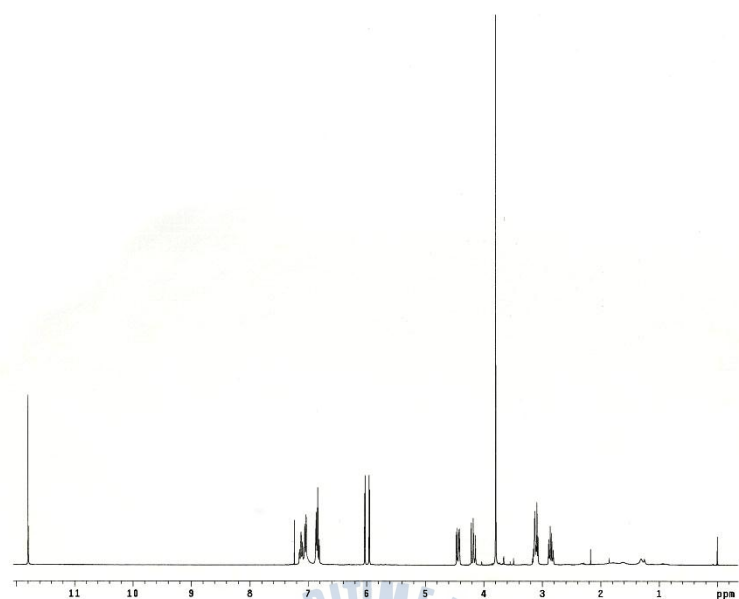


Figure 46 ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound **7** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl_3 .

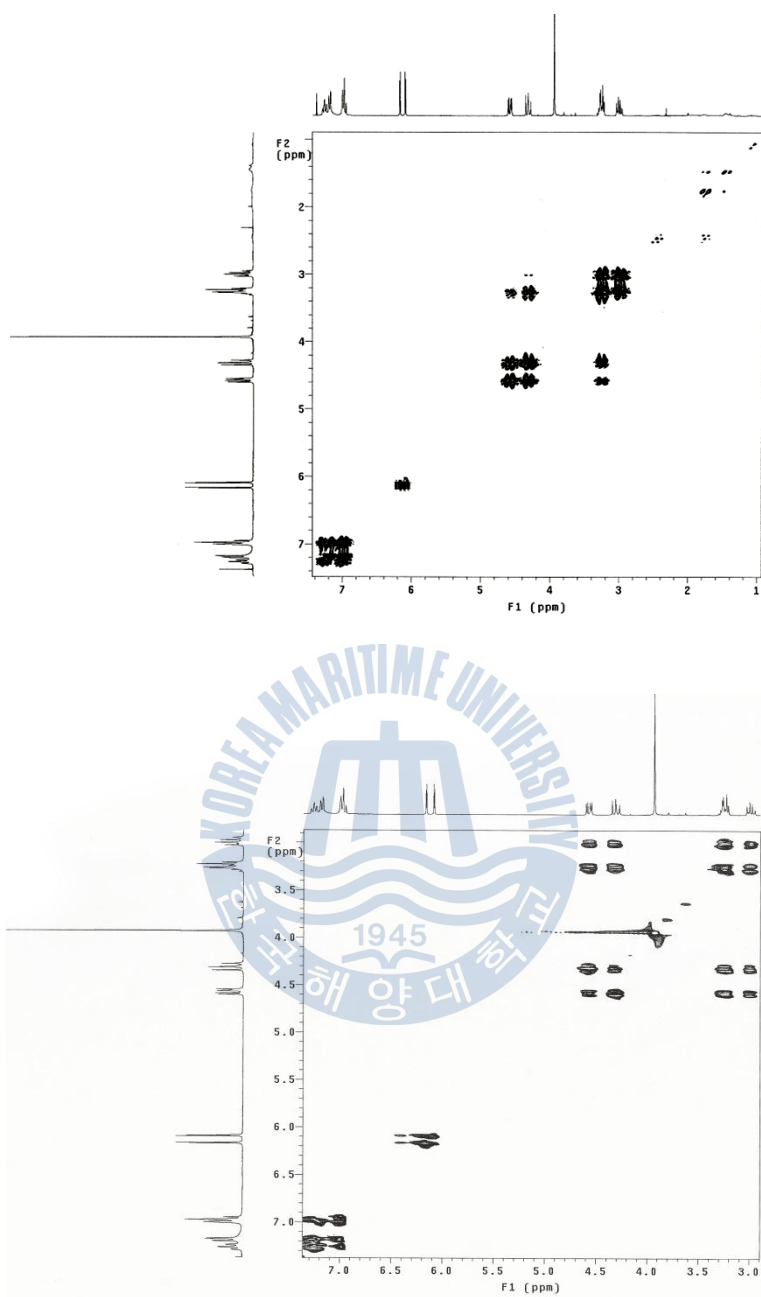


Figure 47. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound **7** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl_3 .

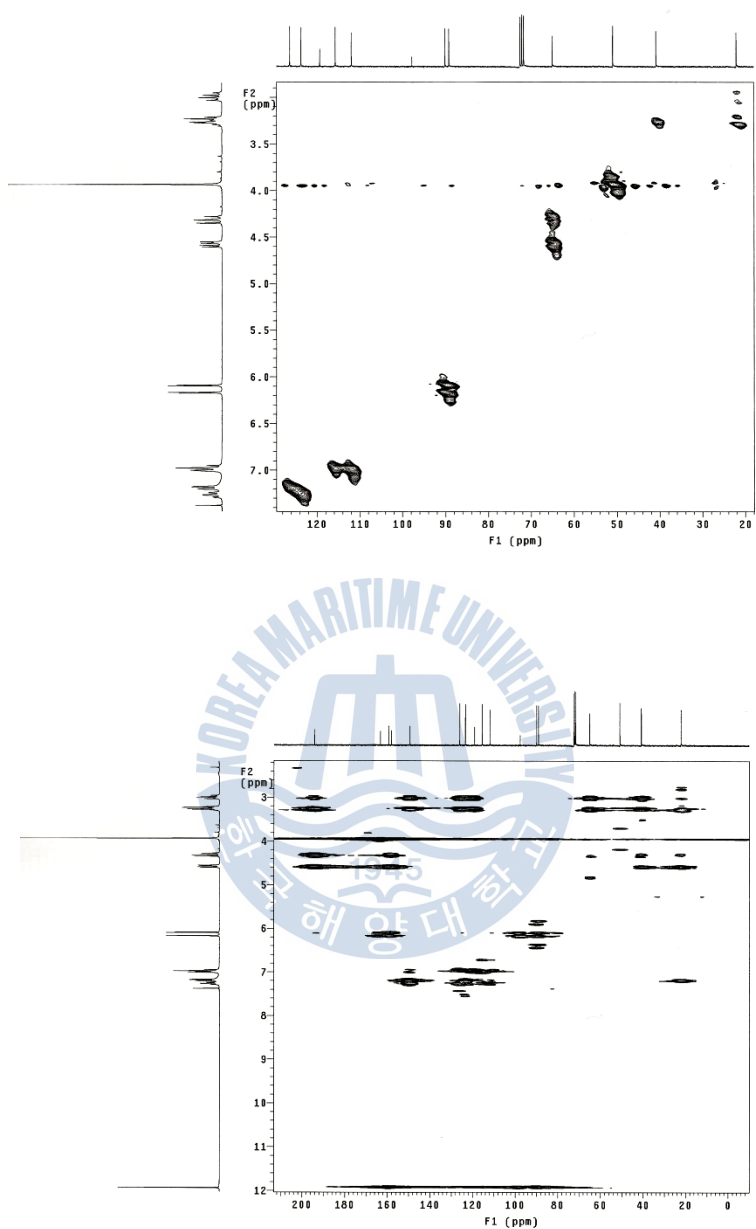


Figure 48 gHMQC and gHMBC spectrum of compound **7** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl₃.

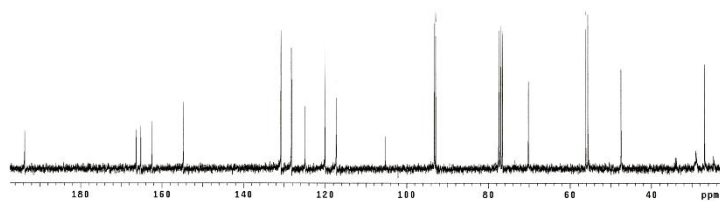
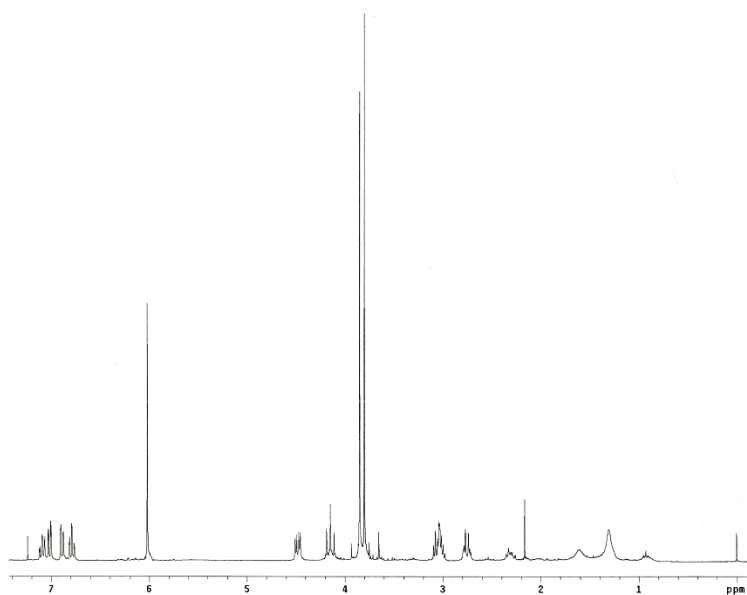


Figure 49. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound **8** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl_3 .

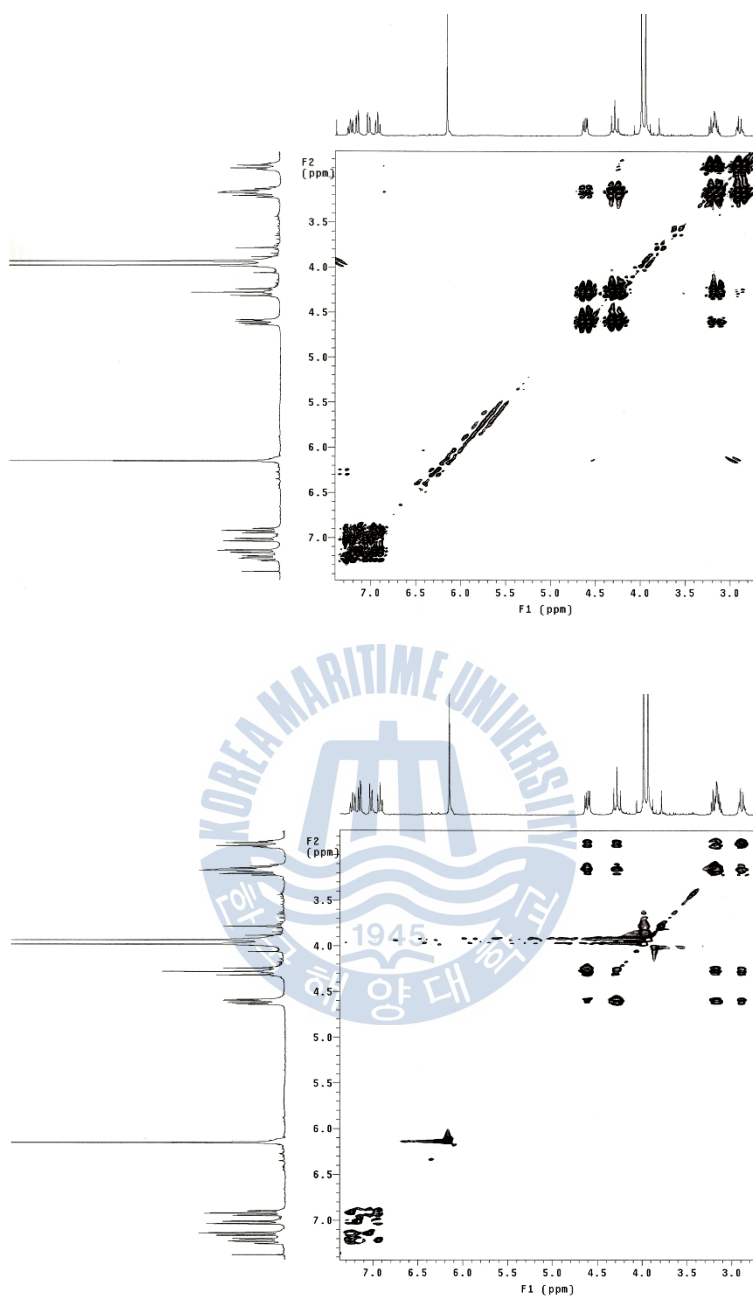


Figure 50. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound **8** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl_3 .

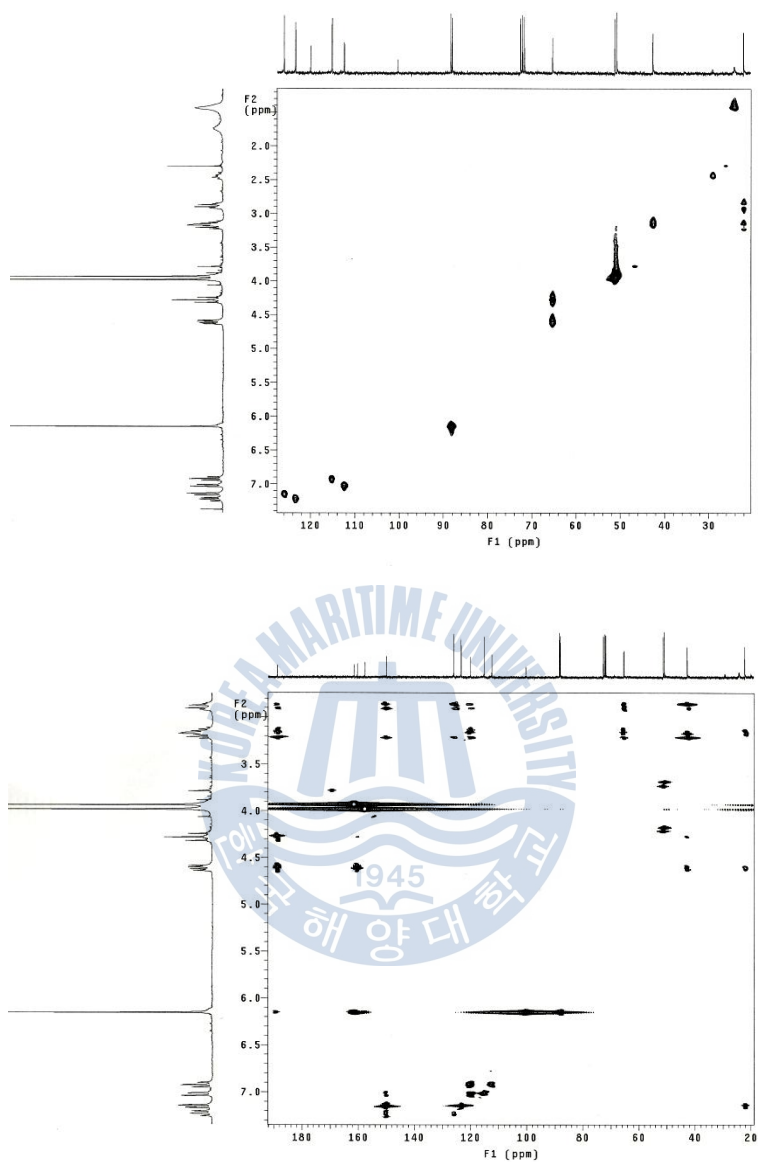


Figure 51. gHMQC and gHMBC spectrum of compound **8** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl_3 .

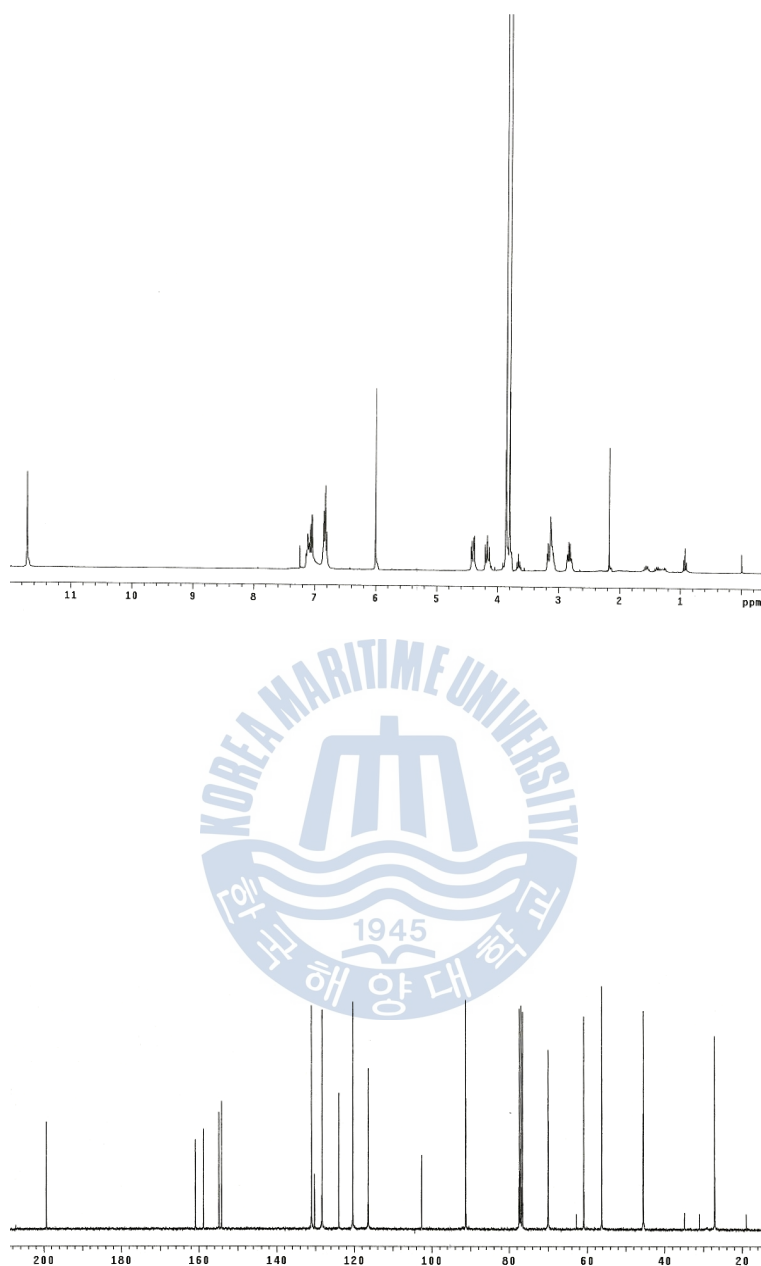


Figure 52. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound **9** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl_3 .

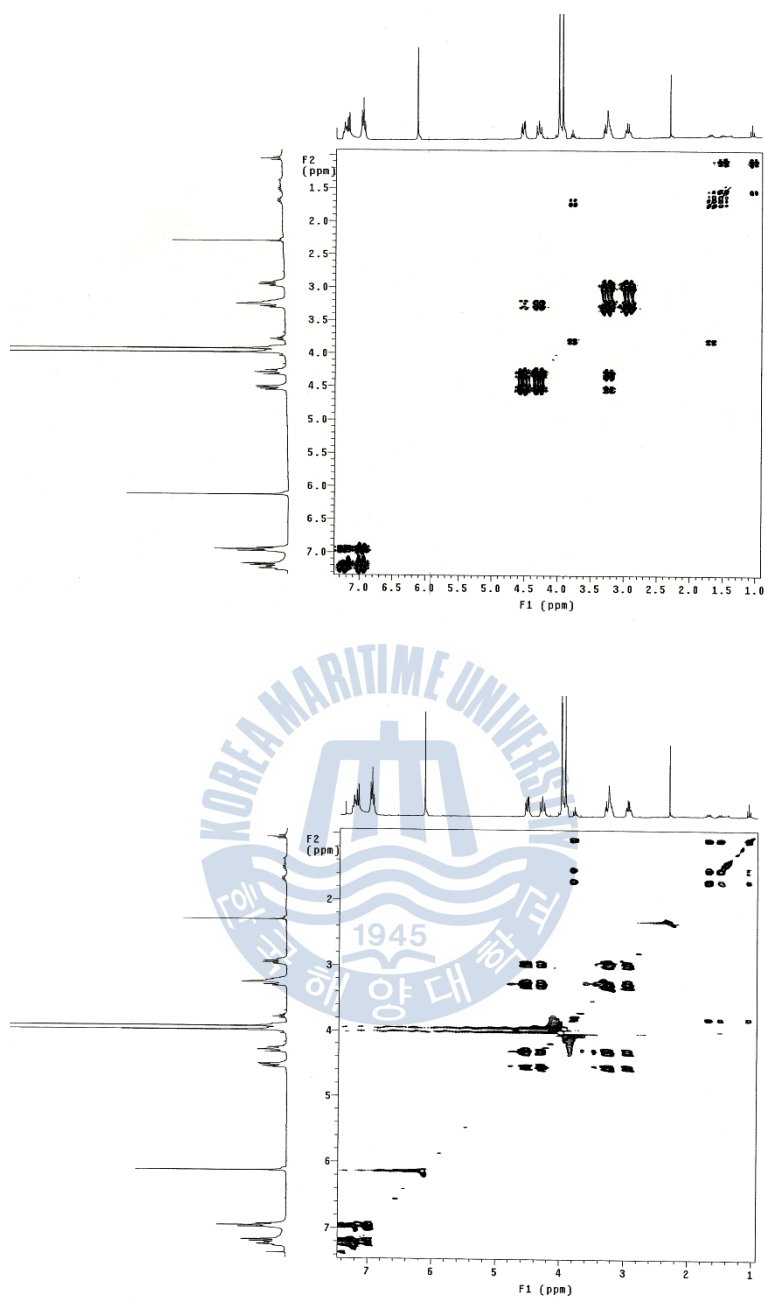


Figure 53. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound **9** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl_3 .

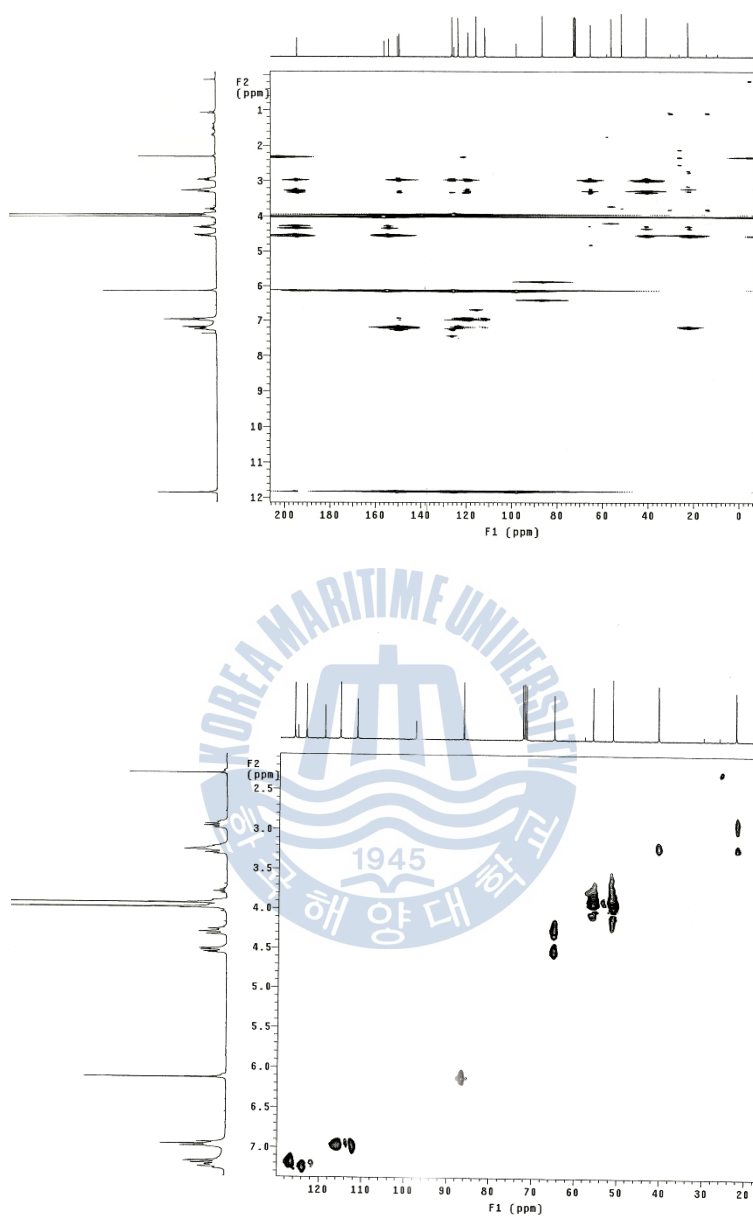


Figure 54. gHMQC and gHMBC spectrum of compound **9** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl_3 .

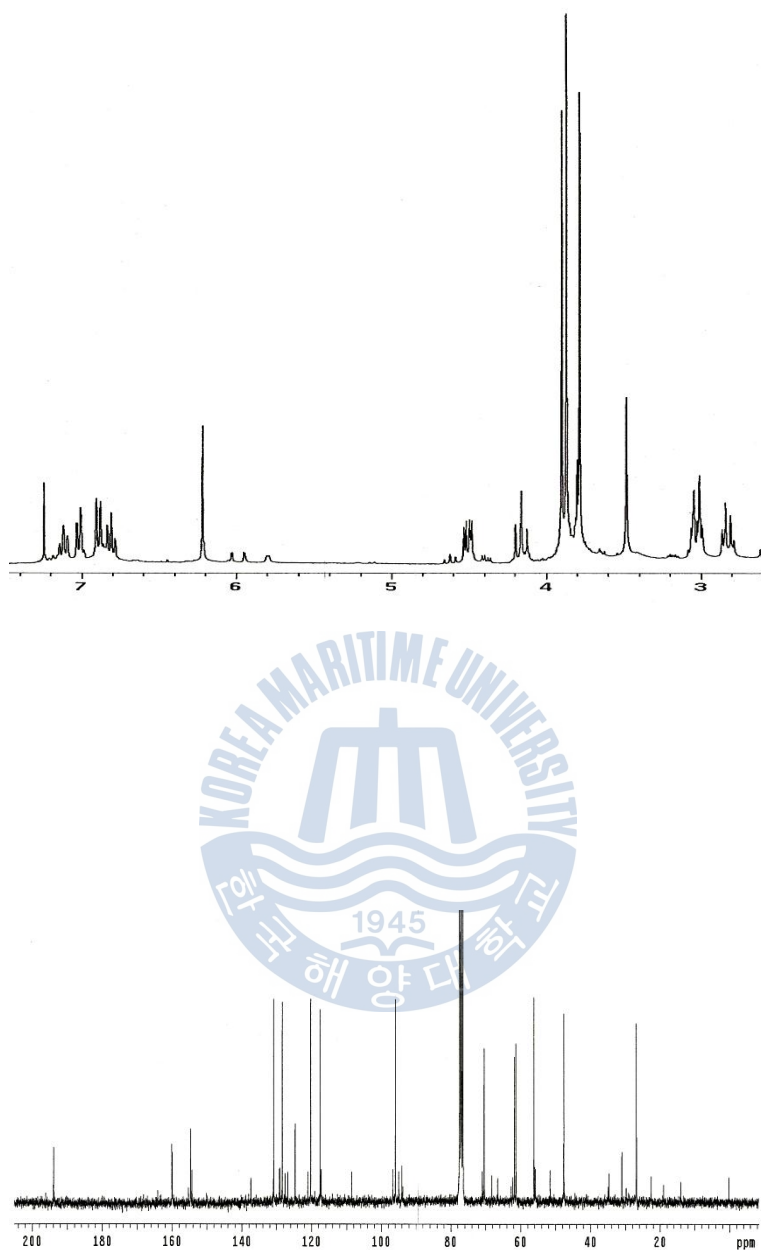


Figure 55. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound **10** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl_3 .

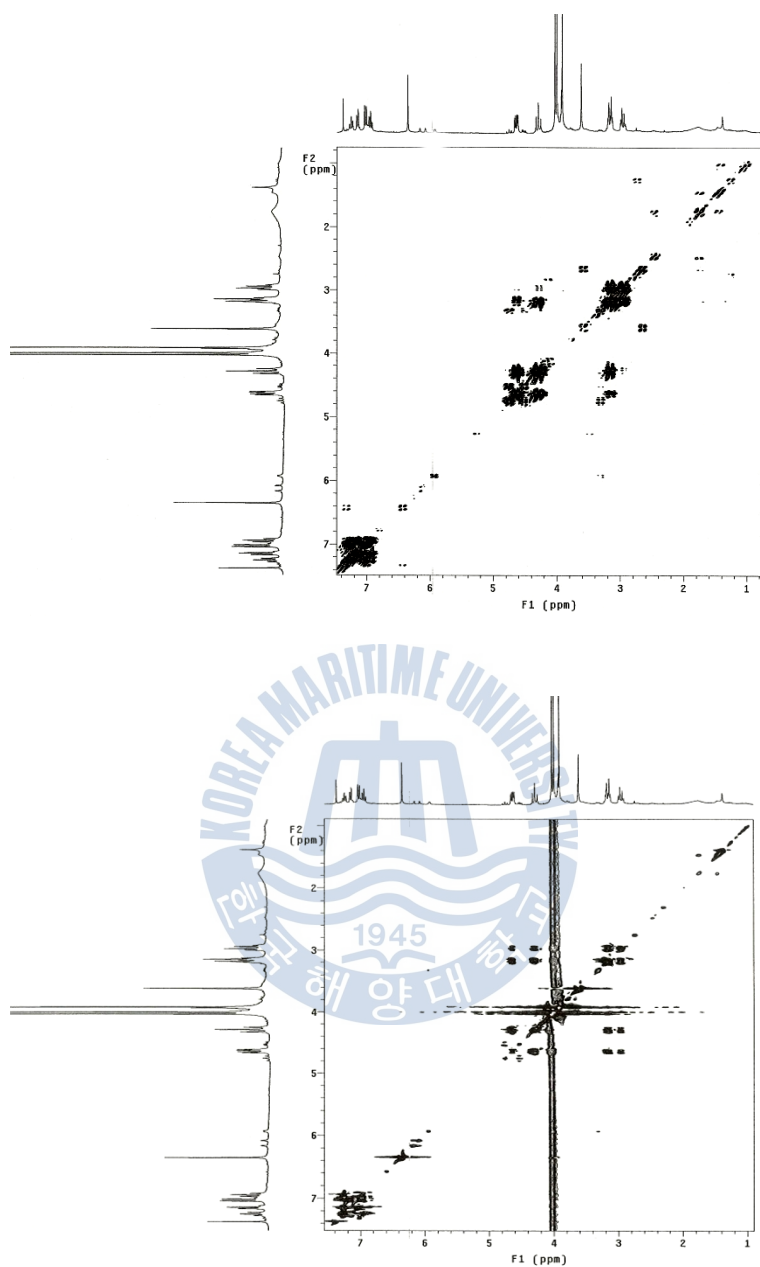


Figure 56. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound **10** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl_3 .

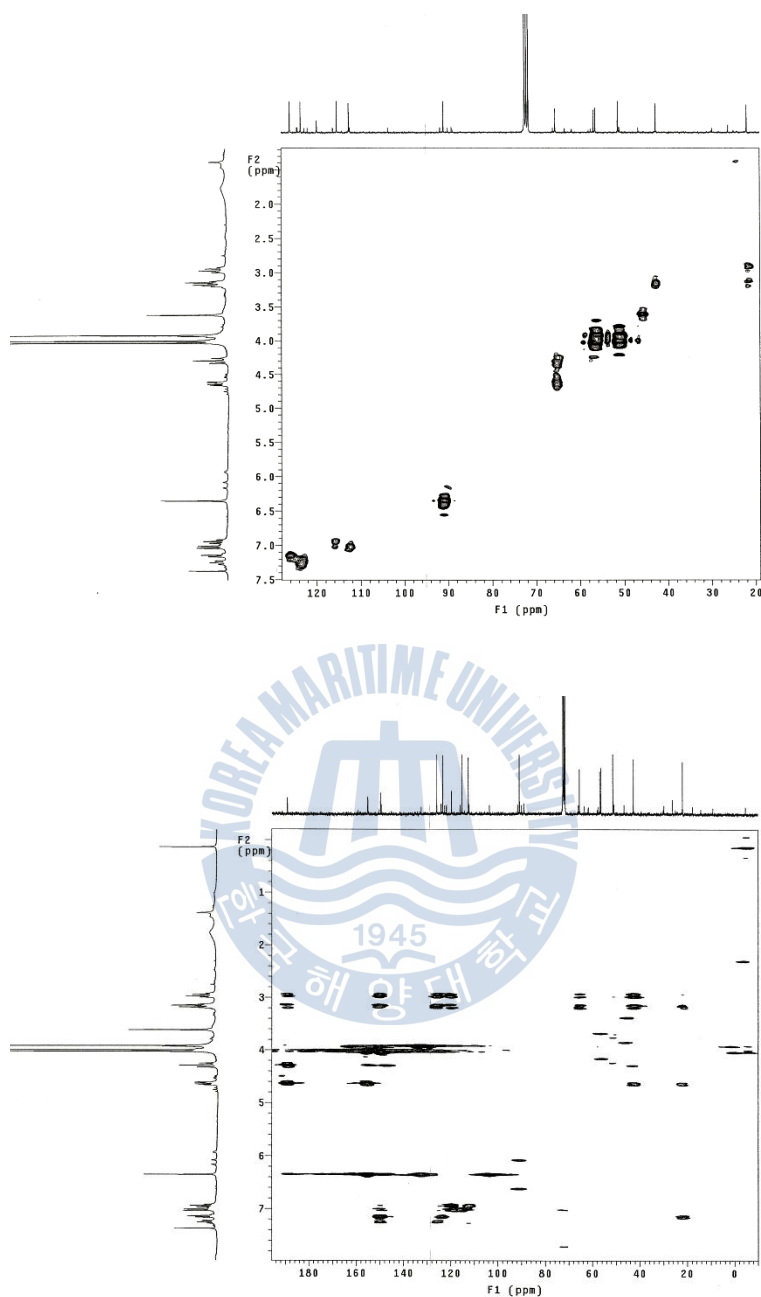


Figure 57. gHMQC and gHMBC spectrum of compound **10** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl_3 .

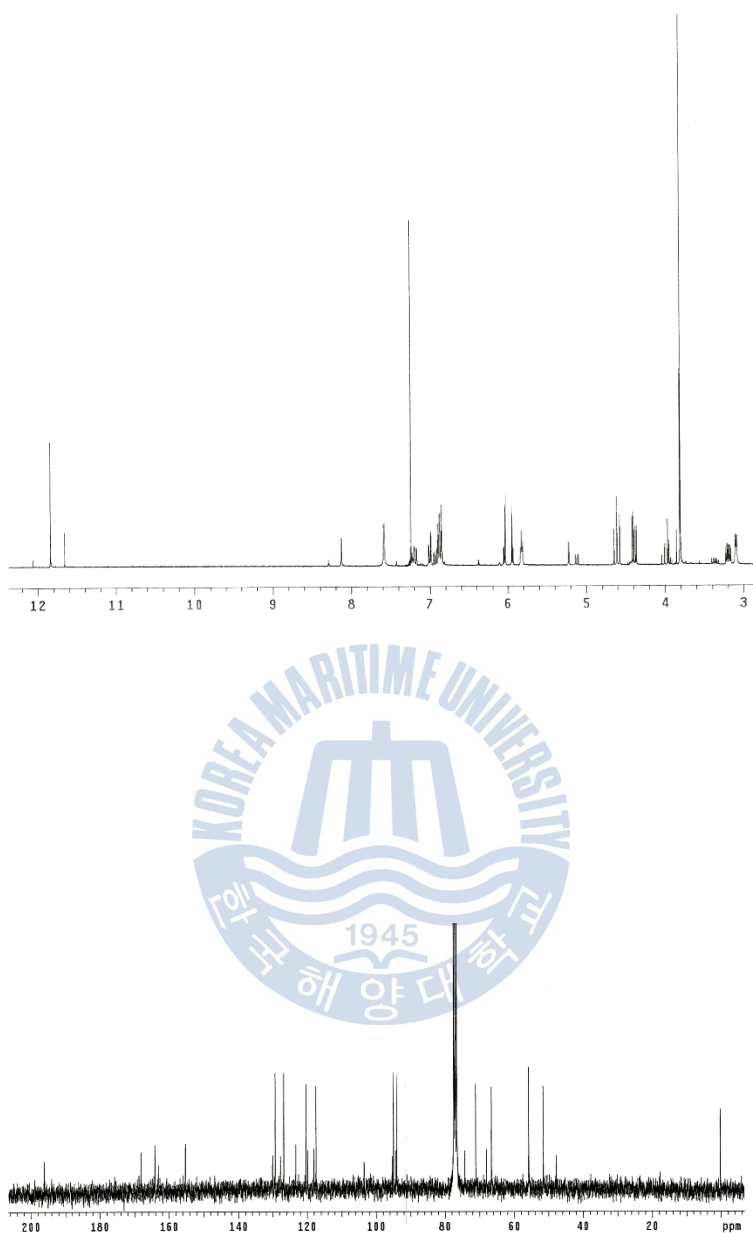


Figure 58. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound **11** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl₃.

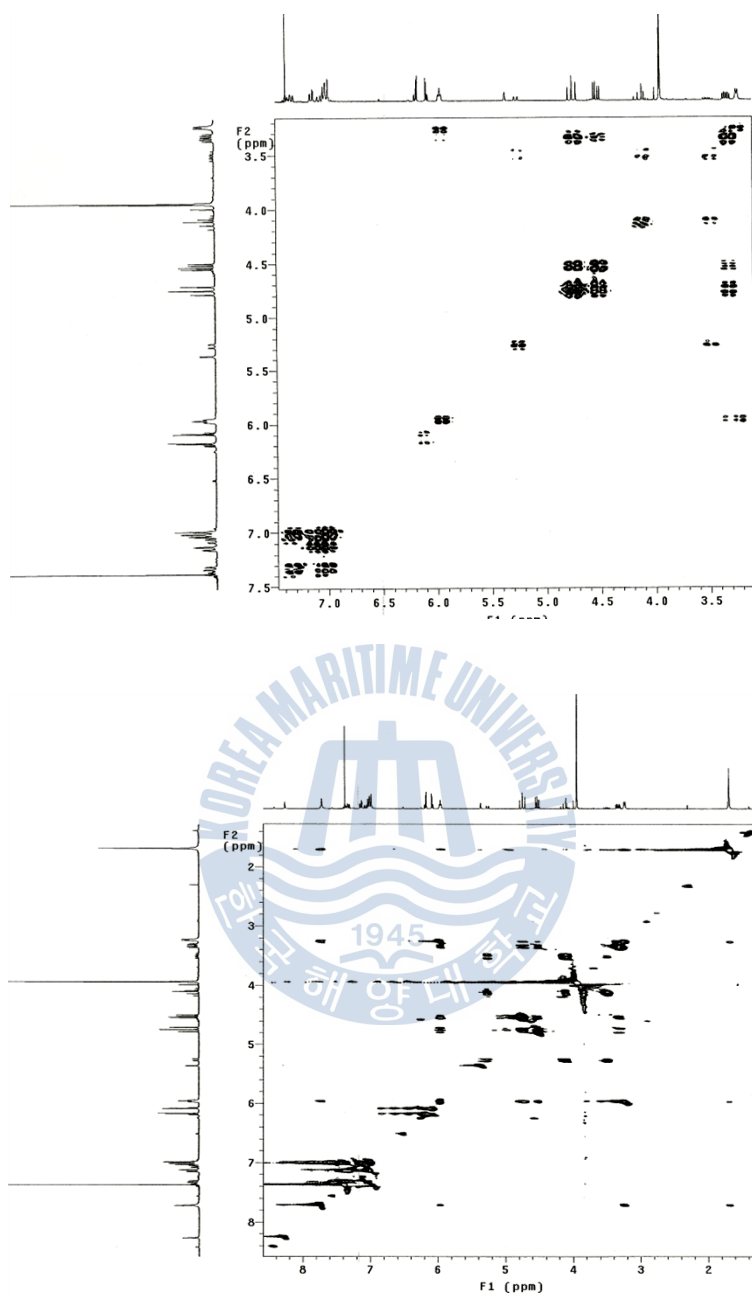


Figure 59. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound **11** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl₃.

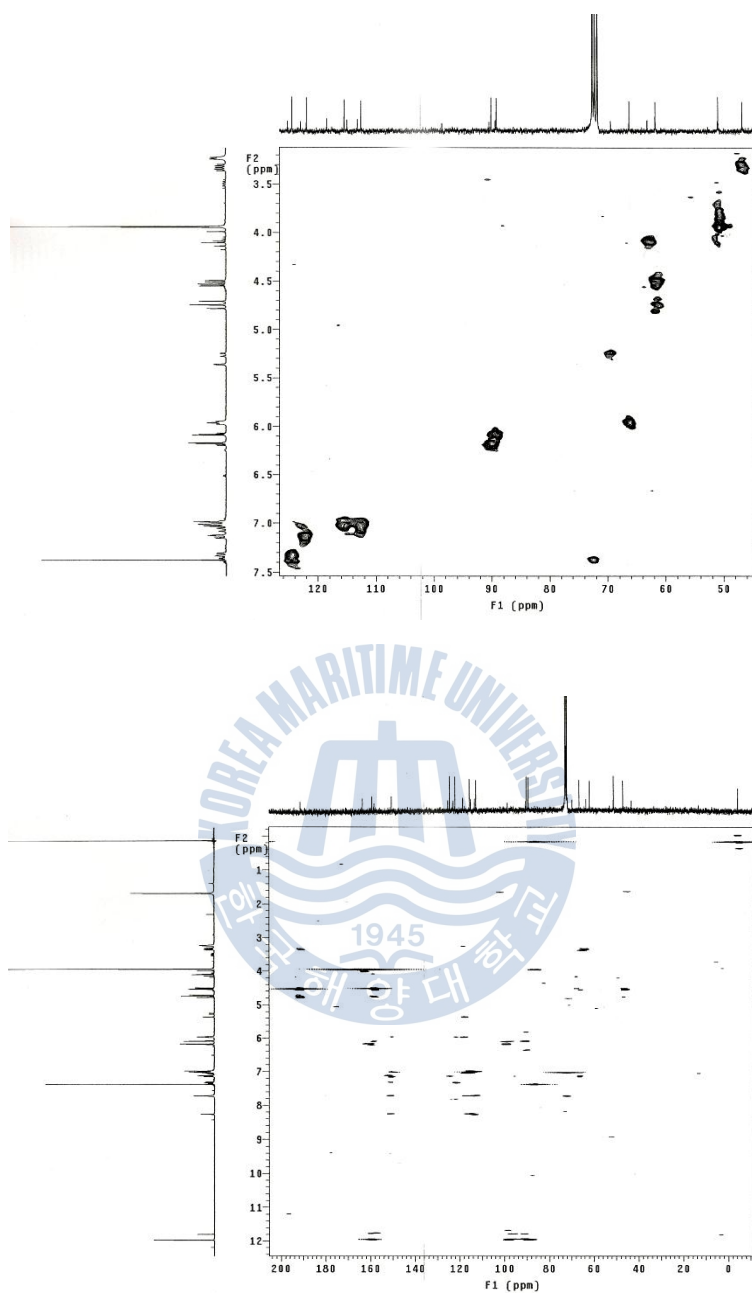


Figure 60. gHMQC and gHMBC spectrum of compound **11** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl_3 .

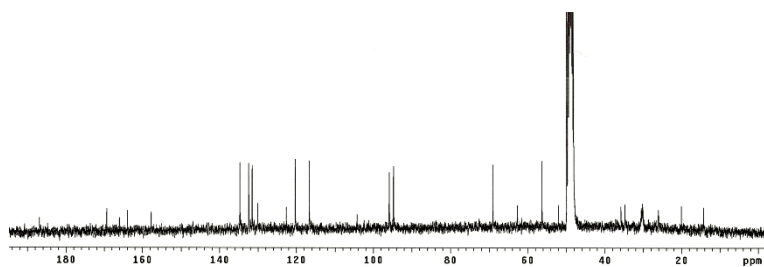
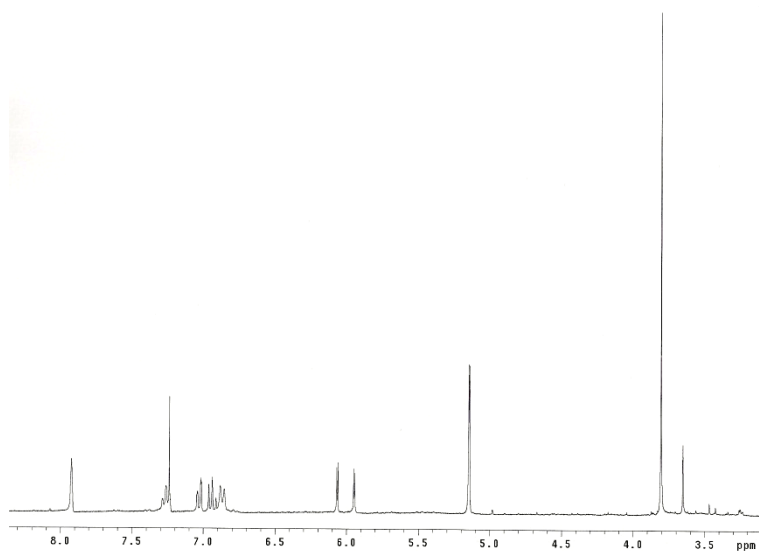


Figure 61. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound **12** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl_3 and CD_3OD

+

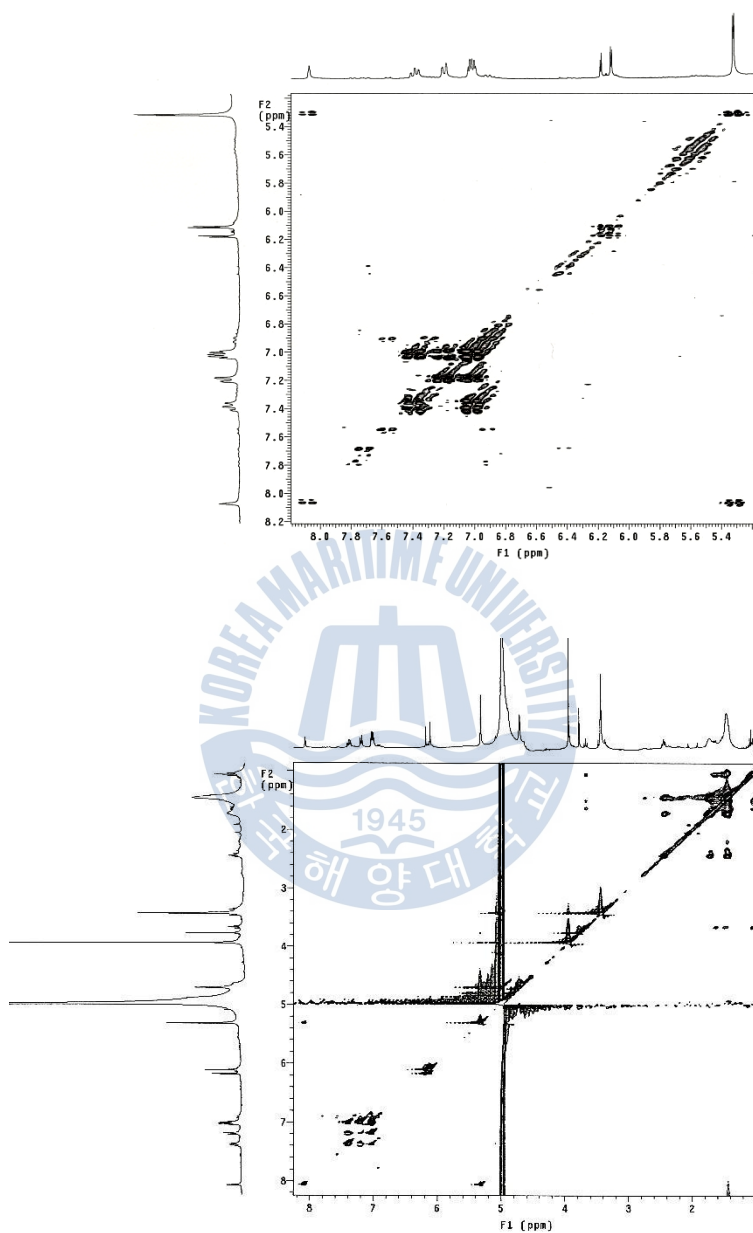


Figure 62. gDQCOSY and TOCSY spectrum of compound **12** isolated from *Portulaca oleracea* in CD₃OD.

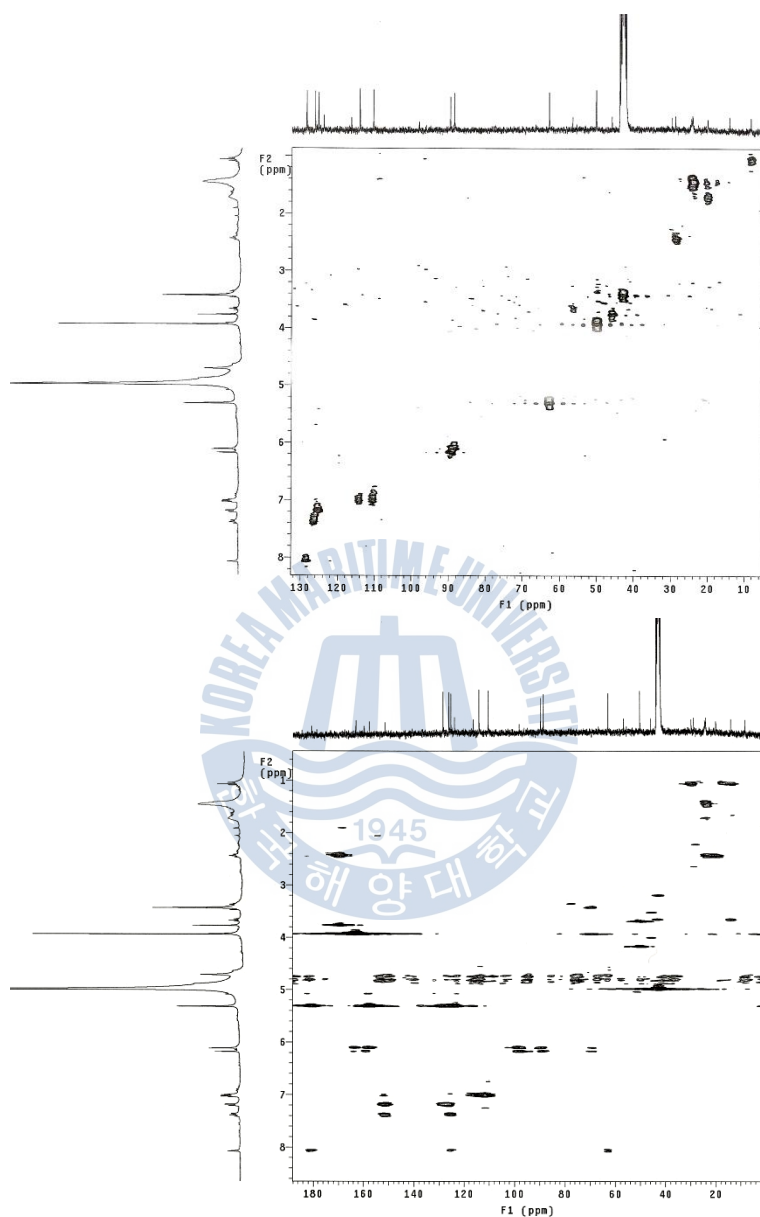


Figure 63. gHMQC and gHMBC spectrum of compound **12** isolated from *Portulaca oleracea* in CD₃OD



Figure 64. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound **13** isolated from *Portulaca oleracea* in CDCl_3 .

감사의 글

4년반이라는 박사과정을 지나 이제 결실을 맺게 되었습니다. 이런 결실을 맺을 수 있게 물심양면으로 도와주신 분들께 감사의 말씀을 드리고 싶습니다. 가장 먼저 9년 동안 부족한 저를 따뜻한 보살핌으로 지도해주시고 이끌어주신 서영완 교수님께 깊은 감사의 뜻을 전합니다. 그리고 여러 분야를 알게 해주시고 가르쳐주신 임선영, 안종웅 교수님, 바쁘신 와중에도 논문을 심사해주신 이범종 교수님, 임치원 연구관님, 박미정 박사님께 진심으로 고개 숙여 감사드립니다. 늘 곁에서 아낌없는 가르침과 성원을 주신 공창숙 교수님께도 진심으로 감사를 드립니다.

항상 모든 면에서 부족한 저를 옆에서 가르쳐 주시고 도와주고 많은 조언을 해주신 유아언니, 늘 옆에서 함께하면서 도와주고 힘이 되어준 명은이, 주완이, 늘 열심히 하고 최선을 다하는 호준이, 명국이도 감사합니다. 지금은 졸업하여 함께하고 있지 않지만 같이 생활하고 함께 공부한 영란이, 진혁이, 해진이.. 항상 힘들 때 마다 옆에서 위로해주고 힘이 되어주었습니다. 10 년동안 함께했던 우리 생유기 신소재 연구실 가족들 모두, 고맙고 사랑합니다.

항상 끊임없는 사랑과 용기를 주시고 지금의 저를 있게끔 해주신 우리 부모님께 감사드리고 사랑한다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 부쩍 어른스러워진 우리 동생 재열이.. 때로는 언니 같고 엄마 같은 우리 이모, 이모부, 지훈이, 강훈이.. 우리 가족 모두 너무 고맙고 사랑합니다.

바쁘다는 이유로 잘 찾아뵙지도 못하는 저를 늘 자랑스럽게 생각해주시고 예뻐해주시는 어머님, 아버님 항상 감사드리고 사랑합니다. 그리고 친언니처럼 잘 챙겨주시는 민정 언니,, 그리고 아주버님께도 감사의 말씀을 전합니다.

끝으로 바쁜 직장 생활속에서도 항상 관심과 응원을 아끼지않은 남편에게 감사와 사랑의 마음을 전하고 싶습니다.

늘 곁에서 이렇게 많은 사람들의 관심과 도움으로 얻어진 이 결실은 끝이 아니라 이제 시작이라는 것을 알고 있습니다. 앞으로 지금까지 겪어온 일보다 더 힘들고 많은 일들이 있겠지만, 지금 받은 사랑과 관심에 보답하는 마음으로 더욱더 열심히 하는 사람이 되도록 하겠습니다.

